

**Die Wechselwirkung von Phospholipiden
mit dem mitochondrialen
Adeninnucleotid-Translokatorprotein
Eine ESR-Untersuchung**

Michael Drees

Disbui. München

1988



Die Wechselwirkung von Phospholipiden mit dem mitochondrialen
Adeninnucleotid-Translokatorprotein
Eine ESR-Untersuchung

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Michael Drees
aus Hagen

MÜNCHEN
12. April 1988

1. Berichterstatter : PD Dr. K. Beyer
2. Berichterstatter : Prof. Dr. G. Hartmann

Abgabe der Arbeit : 12. April 1988

Mündliche Prüfung : 27. Juli 1988

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit zwischen September 1984 und Dezember 1987 am Institut für Physikalische Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München auf Anregung von Herrn Dr. Klaus Beyer durchgeführt, dem ich an dieser Stelle herzlich für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit danken möchte

Weiterhin danke ich Frau Renate Lafuntal und Frau Lieselotte Schmidt-Erhard für die Präparation des Translokatorproteins, die Analysen sowie die Präparation von spinmarkiertem Carboxyatratkylosid.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554816_0063

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
2.	Allgemeines zur Elektronenspin-Resonanz	8
2.1.	Grundlagen	8
2.2.	Die Spinlabel-Methode	10
2.3.	Saturation Transfer-ESR-Spektroskopie	12
3.	Material und Methoden	16
3.1.	Material	16
3.2.	Analytische Methoden	17
3.3.	Synthesen spinmarkierter Verbindungen	17
3.4.	Probenvorbereitung	21
3.5.	ESR-Spektroskopie	22
3.5.1.	Konventionelle ESR-Spektroskopie	22
3.5.2.	Saturation Transfer ESR-Spektroskopie	24
4.	Ergebnisse	29
4.1.	Zur Wahl der geeignetsten Spinmarkierung für Phospholipide	29
4.2.	Lipid-Selektivität des solubilisierten ADP/ATP-Translokators	31
4.3.	Verdrängung der spinmarkierten, proteingebundenen Lipidmoleküle durch unmarkierte Lipide	35
4.4.	Einfluß der Salzkonzentration auf die Lipidbindung des solubilisierten AAC-Proteins	39
4.5.	Abhängigkeit der Phospholipidbindung des AAC vom pH-Wert	41
4.6.	Darstellung der Proteinbindung spinmarkierter Lipide in Form von Auftragungen nach Scatchard	46
4.6.1.	Fehlerbetrachtung	50
4.7.	Versuche zur Zugänglichkeit der proteingebundenen Phospholipide	51
4.7.1.	Reduktion der Nitroxylgruppe mit Ascorbat	52
4.7.2.	Enzymatische Abspaltung der spinmarkierten Fettsäure	55
4.8.	Abhängigkeit der Phospholipidbindung vom Detergens	59
4.8.1.	Triton X-100	59
4.8.2.	Mischungen von Triton X-100 und SDS	61
4.9.	Chemische Modifizierung basischer Aminosäuren des AAC	63
4.10.	Durch Phospholipide ausgelöste Aggregation des solubilisierten AAC-Proteins	72

4.10.1.	Abhängigkeit des Aggregationseffektes von der Lipidstruktur	72
4.10.2.	ESR-spektroskopische Untersuchung der Lipide in Protein-Lipid-Aggregaten	73
4.10.3.	Abhängigkeit der Protein-Aggregation vom Lipid/Protein-Verhältnis	75
4.10.3.1.	Untersuchung der Präzipitation mittels spinmarkiertem Cardiolipin	75
4.10.3.2.	Untersuchung der Präzipitation des spinmarkierten AAC-Proteins	79
4.11.	Untersuchung der Mobilität des AAC-Proteins mit Hilfe der ST-ESR-Spektroskopie	82
4.11.1.	Das AAC-Protein in Rinderherzmitochondrien	83
4.11.2.	Das solubilisierete AAC-Protein in Mizellen von Triton X-100	84
4.11.3.	Das präzipitierte AAC-Protein	85
4.11.3.1.	Aggregation durch Entzug des Detergens	85
4.11.3.2.	Aggregation durch Zusatz von Cardiolipin	88
4.12.	Untersuchung der Mobilität spinmarkierter Phospholipide in Gegenwart des AAC mittels ST-ESR-Spektroskopie	93
5.	Diskussion	94
5.1.	Behandlung von Lipid-Protein-Bindungsgleichgewichten	94
5.2.	Die Art der an der Lipid-Protein-Wechselwirkung beteiligten Kräfte	102
5.3.	Zur Lokalisierung der Bindungsstellen für Cardiolipin in der Sequenz des AAC-Proteins	106
5.4.	Lipidinduzierte Aggregation des AAC-Proteins	111
5.5.	"Internes" und "externes" Cardiolipin	115
5.6.	Zur Beweglichkeit des mitochondrialen Adeninnukleotid-Translokators	117
6.	Zusammenfassung	124
7.	Anhang	126
7.1.	Die Beständigkeit der Konformation des AAC bei pH-Änderungen	126
7.2.	Die Verdrängung des spinmarkierten Inhibitors CATSL durch Pyridoxalphosphat	129
8.	Abkürzungen	131
9.	Literaturverzeichnis	132

1. Einleitung

Wechselwirkungen zwischen Membranproteinen und Phospholipiden

Biologische Membranen bestehen grundsätzlich aus zwei Hauptkomponenten, nämlich Proteinen und Lipiden im Massenverhältnis von 4:1 bis 1:4. Bei den Proteinen unterscheidet man zwischen integralen (intrinsischen) Membranproteinen, die mindestens eine die Membran durchquerende Helix besitzen, und peripheren (extrinsischen) Proteinen, die vorwiegend durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Membran haften und deshalb durch Änderung von pH-Wert oder Ionenstärke des umgebenden Mediums abgelöst werden können. Unter den Lipiden spielen in tierischen und bakteriellen Membranen Glycerophospholipide die Hauptrolle. Sie sind für die allgemein beobachtete Doppelschichtstruktur biologischer Membranen verantwortlich; eindeutige Nachweise anderer Phospholipidstrukturen in biologischen Systemen sind bisher rar.

Die Lipid-Zusammensetzung ist stets heterogen (Übersicht bei Vance & Vance, 1985; Devaux & Seigneuret, 1985; Daum, 1985; Quinn & Williams, 1983). Dabei erstreckt sich die Heterogenität sowohl auf die polaren Kopfgruppen der Phospholipide als auch auf Länge und Sättigungsgrad der Fettsäureketten. Auch die beiden Lagen der Doppelschicht können unterschiedlich zusammengesetzt sein (Übersicht bei Op den Kamp, 1979). So befindet sich nach Krebs et al. (1979) das Cardiolipin der inneren Mitochondrienmembran hauptsächlich auf der Matrix-Seite. Da die transversale Diffusion der Phospholipide sehr langsam verläuft, kann die Biosynthese mit diesem Vorgang Schritt halten, so daß die Asymmetrie der Membran auf Dauer erhalten bleibt.

Hier stellt sich die Frage nach dem Sinn einer so komplizierten und im wesentlichen konstant bleibenden Zusammensetzung. Während die Mischung unterschiedlicher Kohlenwasserstoffketten in erster Linie für optimale Fluidität der Membran, manchmal über einer größeren Temperaturbereich, sorgen, können die Kopfgruppen der Phospholipide an polaren Wechselwirkungen mit den Membranproteinen beteiligt sein. Abgesehen von der bereits erwähnten Verankerung der extrinsischen Membranproteine wurde auch bei bestimmten integralen Membranproteinen eine Bevorzugung bestimmter Lipide nachgewiesen.

Überwiegend handelt es sich dabei um die Besetzung der sog. "boundary layer", der unmittelbar an die Proteinoberfläche angrenzenden Lipid-

schicht, die hauptsächlich ESR-spektroskopisch untersucht worden ist (Übersicht bei Marsh, 1985; Devaux & Seigneuret, 1985). In diesem Phospholipidring sind die Moleküle weniger mobil als in einer ungestörten Doppelschicht; sie sind aber keineswegs fest gebunden und unbeweglich, sondern tauschen mit Zeitkonstanten von 10^{-7} - 10^{-6} s mit ihrer Umgebung aus (Übersicht bei Marsh, 1985; Ryba et al., 1987). Dies ist relativ zur Zeitskala der ESR-Messung (10^{-10} - 10^{-7} s) ein langsamer Vorgang. Mit der NMR-Spektroskopie (Zeitfenster bei $>10^{-5}$ s) kann dieser Austausch dagegen nicht aufgelöst werden, so daß das Vorhandensein einer solchen Grenzschicht NMR-spektroskopisch nicht erkennbar ist. In der "boundary layer" der meisten daraufhin untersuchten Proteine fand man eine Anreicherung negativ geladener Phospholipide (positive kommen in Biomembranen nicht vor). In solchen Fällen spricht man von Lipid-Selektivität des Membranproteins. Andere Proteine wie z.B. der Sehpurpur Rhodopsin zeigten keinen derartigen Effekt.

Zur quantitativen Charakterisierung dieser Selektivität hat man relative Bindungskonstanten eingeführt (Marsh, 1981). Diese dimensionslosen Bindungskonstanten, die in der Regel auf das zwitterionische Phosphatidylcholin bezogen werden, liegen zwischen 1 und 10; die Zahl der Bindungsstellen korreliert mit der Quadratwurzel aus der Molmasse der Proteine und entspricht etwa einem einschichtigen Ring um das jeweilige Protein. Diese Art von "Bindung" ist eher mit der Solvation eines gelösten Moleküls als mit der Substrat- oder Cofaktorbindung von Enzymen vergleichbar. Eine Bindung in der Art eines allosterischen Aktivators wurde bei Membranlipiden bisher nur in wenigen Fällen beobachtet. Ein gut untersuchter Fall ist das extrinsische Membranprotein β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, das durch Lecithin aktiviert wird; etwa 2 Lipidmoleküle werden gebunden (Cortese & Fleischer, 1987). Das integrale Membranprotein Cytochrom P-450 besitzt 1-2 Effektor-Plätze für Phospholipide, deren Affinität von ihrer Kopfgruppe abhängt (Pember et al., 1983). Eine Aktivierung durch Cardiolipin wurde bei weiteren integralen Membranproteinen beobachtet, ohne daß nach spezifischen Bindungsstellen gesucht wurde. Beispielsweise zeigte der mitochondriale Phosphat-Translokator etwa verdreifachte Aktivität, nachdem er mit Cardiolipin behandelt worden war, wogegen andere Phospholipide keine signifikanten Effekte ausübten (Mende et al., 1983).

Einige Membranproteine enthalten nach ihrer Isolierung und Reinigung noch Phospholipid, das anscheinend fest gebunden ist; dies trifft z.B. für Cytochrom c Oxidase (Yu et al., 1975) und den mitochondrialen Adeninnukleotidtranslokator zu (s.u.).

Für die Untersuchung von Lipid-Protein-Wechselwirkungen steht eine Reihe von spektroskopischen Methoden zu Verfügung (Übersicht bei Devaux & Seigneuret, 1985). Die Membranstruktur kann mit Hilfe der Fourier-transformierten Infrarotspektroskopie (Übersicht bei Mantsch et al., 1986) und der Raman-Spektroskopie (Wallach et al., 1979; Wong, 1984) untersucht werden. Wegen der sehr kurzen Zeitskalen der Schwingungsspektroskopie können diese Methoden aber nur Momentaufnahmen liefern. Weiterhin wurden in neuerer Zeit verschiedene optische Methoden entwickelt, u.a. der Einsatz von fluoreszierenden Markierungen an Membranproteinen. Ein Vorteil ist die besonders hohe Empfindlichkeit, Nachteile ergeben sich aus dem begrenzten Angebot an geeigneten Fluoreszenzsonden, die zudem meist recht sperrig sind und u.U. die natürlichen Gegebenheiten beeinträchtigen. Nur in Sonderfällen, z.B. beim Bakteriorhodopsin, stehen interne Chromophore zur Verfügung. Auch sind die erhaltenen Meßkurven optischer Meßmethoden oft nicht eindeutig interpretierbar.

Eine Kombination der NMR-spektroskopischen Untersuchung verschiedener Kerne wie ^1H , ^2H (Übersicht bei Davis, 1983), ^{13}C und ^{31}P stellt wohl den besten Ansatz für eine genaue Bestimmung der Konformation von Phospholipiden dar (s. Watts & DePont, 1985/86). Eine Störung durch Markierungen fällt hier weg oder ist (bei der Deuterium-Markierung) vernachlässigbar gering. Allerdings benötigt man für NMR-Messungen vergleichsweise viel Probenmaterial. Nachteilig für die Untersuchung von Lipid-Protein-Wechselwirkungen wirkt sich auch das Zeitfenster der NMR-Spektroskopie aus (s.o.)

Schließlich ist die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte ESR-Spektroskopie zu nennen. Obwohl die natürlichen Bestandteile von Biomembranen diamagnetisch sind, ist diese Methode wegen der Vielzahl der mittlerweile zur Verfügung stehenden Spinmarkierungen (Gaffney, 1976; Keana, 1979) annähernd universell anwendbar. Der wichtigste Grund für ihren bevorzugten Platz innerhalb der Membran-Spektroskopie liegt aber in dem großen erfaßbaren Zeitbereich von 10^{-10} - 10^{-3} s, der die meisten

biochemisch relevanten Vorgänge einer ESR-spektroskopischen Untersuchung prinzipiell zugänglich macht.

Der ADP/ATP-Translokator aus Rinderherzmitochondrien

Translokatoren oder molekulare "carrier"-Proteine stellen besonders typische Beispiele integraler Membranproteine dar, da sie ihre Funktion nur innerhalb einer sonst dicht geschlossenen Membran ausüben können. Eines der am besten untersuchten Proteine dieser Klasse ist der mitochondriale Adeninnukleotid-Translokator, im folgenden Text meist AAC abgekürzt. Er erreicht in der inneren Mitochondrienmembran einen Anteil von etwa 9% an der Gesamtmenge der dort vorkommenden Proteine (Klingenberg, 1978). Seine Funktion besteht im Austausch des im Matrixraum gebildeten ATP gegen externes ADP. Von den umfassenden über dieses Protein vorliegenden Daten (Klingenberg, 1985) sollen hier nur die wichtigsten und auch für die vorliegende Arbeit bedeutsamen dargestellt werden.

Der AAC ist ein Dimer aus identischen Untereinheiten mit einer Molmasse von 33000, die sich aus der Aminosäuresequenz des Proteins ergibt (Aquila et al., 1982). Seine dimere Struktur wurde aus analytischen Ultrazentrifugationen abgeleitet (Hackenberg & Klingenberg, 1980). Der AAC nimmt im Laufe der Transportreaktion zwei unterschiedlichen Konformationen ein, bei denen die Nukleotidbindungsstelle - das dimere Protein besitzt nur eine - zur Innen- bzw. Außenseite der Membran orientiert ist und die danach als "m"- (Matrix) und "c"- (Cytosol) Zustand bezeichnet werden. Ein Übergang von einem in den anderen Zustand ist nur unter Katalyse der Substrate ADP oder ATP möglich. In jeder der beiden Konformationen kann das Protein durch spezifische Inhibitoren stabilisiert werden: Im "m"-Zustand wird das membrangängige Bongkrekat (BKA), im "c"-Zustand die impermeablen Glykoside Atraktylosid (ATR) und Carboxy-Atraktylosid (CAT) gebunden. Die Dissoziationskonstanten der AAC-Inhibitorenkomplexe nehmen in der Reihenfolge $ATR \gg BKA \gg CAT$ ab (Klingenberg, 1985), so daß eine Verdrängung von ATR durch BKA bzw. von BKA durch CAT unter ADP-Zusatz möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wird von der Stabilisierung des Proteins durch CAT Gebrauch gemacht.

Zwar konnte der AAC auch im "m"-Zustand isoliert werden (Aquila et al., 1978), doch ist die Stabilität des BKA-AAC-Komplexes über längere

Zeiträume unbefriedigend (Klingenberg et al., 1979). Es ist daher vorteilhaft, den ATR-Komplex zu isolieren (Aquila et al., 1982) und diesen in Gegenwart von ADP und BKA in den "m"-Zustand umzulagern.

Darüber hinaus ist es gelungen, den AAC in nativer (unligandierter) Form in Phospholipidvesikel einzubauen und mit derartigen Präparationen den Nukleotidtransport zu messen (Krämer & Klingenberg, 1977). Dabei stellte sich heraus, daß die Transportrate von der Zusammensetzung dieser Vesikel abhängt. Bei binären Gemischen von Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) war die Aktivität des AAC um so höher, je größer der Anteil des PE war (Krämer & Klingenberg, 1980). Die höchsten Transportraten wurden in Anwesenheit negativ geladener Phospholipide, besonders von Cardiolipin, gemessen. In der Tat enthält die innere Mitochondrienmembran als natürliche Umgebung des AAC etwa 20 Gew.-% Cardiolipin (Colbeau et al., 1971). In reinen Lecithin-Vesikeln lag die Transportrate etwa um zwei Größenordnungen unterhalb des erzielbaren Maximums.

Für den Transport der mehrfach negativ geladenen Adenin-Nukleotide über die innere Mitochondrienmembran ist eine Aktivierungsenergie von 60 kJ/mol nötig (Klingenberg, 1985). Es ist vorgeschlagen worden, daß diese u.a. durch Lipid-Protein-Wechselwirkungen bereitgestellt werden könnte (Klingenberg 1978, 1985).

Vor drei Jahren konnte dann besonders aufgrund NMR-spektroskopischer Daten gezeigt werden, daß der in Form seines CAT-Komplexes isolierte AAC stets eine größere Menge Cardiolipin enthält, das bisher nur unter denaturierenden Bedingungen entfernt werden konnte (Beyer & Klingenberg, 1985). Die anderen mitochondrialen Phospholipide PC und PE ließen sich auch durch Dichtegradienten-Zentrifugation abtrennen. Es liegt nahe, den Grund für die Bevorzugung des Cardiolipins in den 18 positiven Überschüßladungen des (monomeren) AAC zu suchen. Seine Aminosäuresequenz enthält auffallend häufig Lysin und Arginin, deren basische Seitenketten Kandidaten für Kontaktstellen negativ geladener Lipide sind. Andere Reste dieser Art sind sehr wahrscheinlich an der Substrat- bzw. Inhibitorenbindung beteiligt.

Voraussetzung einer Wechselwirkung von Phospholipid-Kopfgruppen mit geladenen Aminosäureketten ist in jedem Fall, daß sich letztere an oder wenigstens in der Nähe der Membranoberfläche befinden. Dieser Punkt

wurde durch chemische Modifikation von Lysinresten mittels Pyridoxalphosphat bereits eingehend untersucht (Bogner et al., 1986). Im "m"-Zustand des AAC ließen sich neun Lysine von der Außenseite der Membran und drei von deren Innenseite aus markieren, zwei davon waren beiderseits zugänglich. Im "c"-Zustand wurden acht Lysinreste von außen und drei von innen her modifiziert, eines von beiden Seiten. Am solubilisierten CAT-AAC-Protein erwiesen sich zwölf der 22 vorhandenen Lysine als reaktiv, wobei erheblich mehr Pyridoxalphosphat eingebaut wurde als im Fall des membrangebundenen Proteins. Letzteres spricht für eine Abschirmung der Lysinreste durch Phospholipid-Kopfgruppen (Bogner et al., 1986).

Die Zugänglichkeit der Argininreste kann durch Markierung mit den spezifischen Reagenzien Phenylglyoxal oder 2,3-Butandion in analoger Weise untersucht werden. Beide Modifizierungsreagentien wurden bereits am AAC angewendet (Klingenberg & Appel, 1980; Block et al., 1981). Da die Zielsetzung beider Arbeiten aber hauptsächlich auf die Inhibitoren-Bindungsstelle gerichtet war, sind die Positionen der Argininreste des AAC relativ zur Membran noch weitgehend unbekannt. Natürlich müssen auch sie in Überlegungen über Protein-Phospholipid-Wechselwirkungen einbezogen werden.

Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe der Elektronenspin-Resonanzspektroskopie sollte die Wechselwirkung von Phospholipiden mit dem ADP/ATP-Translokatorprotein aus der inneren Mitochondrienmembran untersucht werden. Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, daß dies vorteilhaft am solubilisierten Protein nach Abtrennung der mitochondrialen Phospholipide geschehen kann, weil so die Beiträge einzelner Phospholipide am ehesten isolierbar waren.

Zu diesem Zweck sollten spinmarkierte Phospholipide eingesetzt werden. Einige Fettsäurederivate mit unterschiedlicher Lage der Spinmarkierung sind käuflich. Die günstigste Markierung für die Untersuchung des vorliegenden Systems aus gemischten Detergens-Mizellen mußte vor einer eingehenden Bearbeitung allerdings erst ermittelt werden. Dabei kam es darauf an, bei physiologischen Temperaturen möglichst gut aufgelöste Zweikomponentenspektren zu erhalten (s. Abschnitt 4.1.)

Zur Untersuchung langsamer Molekülbewegungen konnte die Methode der Saturation Transfer ESR-Spektroskopie herangezogen werden. Die sorgfältige Kalibrierung des vorhandenen Spektrometers war als Vorarbeit für die ST-ESR-Spektroskopie unerläßlich. Diese Methodik bot sich vor allem für die Erfassung der Mobilität des AAC-Proteins selbst an. Die spezifische Markierung dieses Proteins mit Spinsonden wurde bereits in zwei Arbeiten beschrieben (Munding et al., 1983, 1987), die sich jedoch auf die Anwendung der konventionellen ESR-Spektroskopie beschränkten.

Folgende Fragen werden in der vorliegende Arbeit behandelt:

- 1) Ruft das solubilisierete AAC-Protein eine Immobilisierung benachbarter Lipidmoleküle hervor, wie sie für andere Membranproteine in rekonstituierten Systemen beobachtet wurde, und ist ein solcher Effekt von der Kopfgruppe der Lipide abhängig?
- 2) Lassen sich quantitative Angaben über eine derartige "Bindung" von Lipiden an der Proteinoberfläche gewinnen?
- 3) Welche Aminosäuren des AAC kommen als Kontaktstellen für die Phospholipide seiner natürlichen Membranumgebung in Frage?
- 4) Beeinflussen die amphiphilen Moleküle in der Umgebung des AAC-Proteins seine effektive Rotationskorrelationszeit sowie die Anisotropie seiner Bewegung?

2. Allgemeines zur Elektronenspinresonanz (ESR-Spektroskopie)

2.1. Grundlagen

Die ESR-Spektroskopie ist eine der in der Chemie allgemein eingesetzten NMR-Spektroskopie analoge Meßmethode, die das magnetische Moment ungepaarter Elektronen ausnutzt; diese treten u.A. in freien Radikalen und in den Ionen der meisten Übergangsmetalle auf.

Eine quantenmechanische Betrachtung ergibt für den Elektronendrehimpuls P (Spin) in einem statischen äußeren Magnetfeld zwei diskrete mögliche Werte:

$$P_z = \frac{h}{2\pi} \cdot m_z \quad \text{mit } m_z = \pm \frac{1}{2}$$

Das magnetische Moment des freien Elektrons in Feldrichtung ist dann

$$\mu_z = -g \cdot \frac{e \cdot h}{4\pi m c} \cdot m_z = -g \beta m_z$$

$\beta = \frac{e h}{4\pi m c}$ wird als Bohrsches Magneton bezeichnet. Der g -Faktor tritt bei einer klassischen Behandlung des Phänomens nicht in Erscheinung. Sein Wert für das freie Elektron beträgt $g = 2,002319$; in paramagnetischen Atomen und Molekülen kann der g -Faktor durch den Einfluß angeregter Zustände mit Orbitaldrehimpuls stark von diesem Wert abweichen.

Der Elektronenspin ist im Magnetfeld auf zwei Energieniveaus verteilt:

$$E = \pm \frac{1}{2} \cdot g \cdot \beta \cdot H,$$

wobei das energiereichere Niveau gemäß der Boltzmann-Verteilung von weniger Elektronen besetzt ist als das niedrigere Niveau. Durch elektromagnetische Strahlung, deren Frequenz der Differenz zwischen diesen Energieniveaus entspricht, werden Übergänge zwischen ihnen angeregt. Die Resonanzbedingung lautet also

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot H_{\text{res}}.$$

Da sich die Frequenz der elektromagnetischen Strahlung im Mikrowellenbereich aus technischen Gründen nicht beliebig variieren läßt, geht man praktisch immer den Weg über die Änderung der Magnetfeldstärke (Feld-Sweep). Je nach der angewendeten Mikrowellenfrequenz spricht man dabei von verschiedenen "Bändern"; die meisten Spektren werden im X-Band, d.h. mit einer Frequenz von 9-10 GHz aufgenommen.

Zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit wird das Magnetfeld sinusförmig moduliert. Daher wird nicht, wie in der NMR-Spektroskopie, das Absorptionsspektrum, sondern dessen erste Ableitung registriert. Signale treten nur dann auf, wenn die Resonanzbedingung erfüllt ist ($H = H_{\text{res}}$). In der Praxis erhält man verbreiterte Linien, und zwar durch zwei grundsätzlich verschiedene Mechanismen:

- 1) Die Energieniveaus werden durch lokale Magnetfelder benachbarter Elektronen und Atomkerne gestört. Man spricht dann von säkularer Linienverbreiterung.
- 2) Wegen der Heisenbergschen Unschärferelation ist $\Delta\nu \geq \frac{1}{2\pi \cdot \Delta t}$ mit Δt = Lebensdauer des Elektrons in einem Quantenzustand. Diesen Fall bezeichnet man daher als Lebensdauer- oder nichtsäkulare Verbreiterung. Dabei ist $\overline{\Delta t} = 2T_1$, wobei T_1 die Spin-Gitter-Relaxationszeit bezeichnet; mit dieser Zeitkonstante verteilen sich nach dem Einschalten der Magnetfeldes die Elektronen auf die Energieniveaus.

Außerdem trägt noch die sog. Spin-Spin-Relaxationszeit (T_2) zur Linienverbreiterung bei; sie enthält u.A. alle säkularen Vorgänge (s.o.). Für homogen verbreiterte Linien (Lorentzlinien) gilt:

$$\Delta\nu = \frac{1}{\pi} \cdot \left[\frac{1}{T_2} + \frac{1}{2T_1} \right]$$

Ein für viele Anwendungen der ESR-Spektroskopie wichtiger Fall liegt vor, wenn das paramagnetische Molekül schnell zwischen zwei Zuständen mit unterschiedlicher Resonanzfrequenz wechselt. Dieser Vorgang führt zu einer Linienverbreiterung, aus deren Ausmaß die mittlere Lebensdauer $\overline{\Delta t}$ der beiden Formen berechnet werden kann:

$$\Delta H = \Delta H_0 + \frac{1}{2\gamma \overline{\Delta t}}$$

Noch schnellere Austauschvorgänge führen zum Zusammenrücken und schließlich zum Verschmelzen beider Linien (Koaleszenz).

Die Wechselwirkung mit Atomkernen mit Kernspin I (z.B. ^1H , ^{14}N) führt zu einer Aufspaltung der ESR-Linie des ungepaarten Elektrons. Diese Wechselwirkung besteht aus einem anisotropen (richtungsabhängigen) und einem isotropen Anteil. Durch Rotation der Moleküle in Lösung mit Zeitkonstanten unter 10^{-10} s wird der anisotrope Anteil herausgemittelt.

Analog zur Kernspin-Resonanz erfolgt eine Aufspaltung in $n = 2I + 1$

Linien. Die Differenz der entsprechenden Energieniveaus ist dann durch

$$\Delta E = g\beta \cdot H_0 + hA_0 M_z$$

(h = Planck'sche Konstante, A_0 = Wechselwirkungskonstante in Hertz für den isotropen Fall) und die Resonanzfeldstärke durch

$$H_{\text{res}} = H_0 + \frac{h}{g\beta} \cdot A_0 \cdot M_z$$

gegeben. In hier nicht behandelten Spezialfällen treten zusätzliche Energieterme (z.B. eine Nullfeldaufspaltung) auf.

2.2. Die Spinlabel-Methode

Für die ESR-spektroskopische Untersuchung biochemisch relevanter Moleküle, die kein paramagnetisches Zentrum besitzen, wurde vor etwa 20 Jahren die sog. Spinlabel-Methode entwickelt. Hierbei wird ein stabiles Radikal chemisch an das zu untersuchende Molekül gebunden, um Aufschluß über dessen Beweglichkeit und (seltener) Konformation zu gewinnen.

Dabei wird fast immer die Nitroxylgruppe als paramagnetisches Zentrum eingesetzt. Ihre Vorzüge sind sowohl chemischer als auch spektroskopischer Natur. Nitroxyl-Spinsonden ohne α -ständige H-Atome gehören zu den stabilsten bekannten Radikalen und sind in verdünnter Lösung praktisch unbegrenzt haltbar. Von Luftsauerstoff, alkalischen und schwach sauren Lösungen ($\text{pH} > 3$) wird die Nitroxylgruppe nicht angegriffen und ist auch gegen manche Reduktionsmittel, z.B. NaBH_4 , beständig. Andererseits kann die Reduzierbarkeit derartiger Radikale z.B. durch Ascorbat für manche Fragestellungen ausgenutzt werden.

Unter den ESR-spektroskopischen Eigenschaften ist an erster Stelle die Hyperfeinaufspaltung in drei Linien (bei ^{15}N -Spinsonden nur in zwei) zu nennen. Da das ungepaarte Elektron sich in einem "hantelförmigen" p-Orbital aufhält, sind die Werte für den g-Faktor und die Hyperfeinaufspaltung A von der räumlichen Anordnung des Moleküls relativ zum äußeren Magnetfeld abhängig. Durch den Einbau der Nitroxylgruppe in ein Molekül kommt es zusätzlich zu Wechselwirkungen zwischen diesem p-Orbital und anderen Elektronen sowie mit Atomkernen. Die beiden Größen A und g lassen sich mathematisch am besten als Tensoren behandeln. Zur Vereinfachung wird ein molekulares Hauptachsensystem so definiert, daß in ihm ein Tensor diagonal ist, d.h. nur die auf der Diagonale seiner Matrix stehenden Elemente von Null verschieden sind. Im Fall der Nitro-

xyl-Spinsonden ist für den A- und den g-Tensor ein gemeinsames Achsen-system verwendbar. Bei Planarität der Nitroxylgruppe ($\begin{smallmatrix} \text{C} \\ \diagup \text{N-O}^{\cdot} \\ \diagdown \text{C} \end{smallmatrix}$), wie sie

z.B. beim t-Butyl-Nitroxid verwirklicht ist, fällt die x-Achse mit der N-O-Bindung, die y-Achse mit der Verbindungslinie der beiden C-Atome zusammen; die z-Achse steht senkrecht auf dieser Ebene und bildet die Längsachse des p-Orbitals, in dem das Radikal-Elektron sich aufhält.

Der A-Tensor ist in guter Näherung axialsymmetrisch mit $A_{xx} \approx A_{yy} \approx 6$ Gauss, $A_{zz} \approx 32$ Gauss, während der g-Tensor eine geringere, allerdings nicht axialsymmetrische Anisotropie aufweist (s. Abb.1). Wie bei den meisten organischen Radikalen liegen seine Tensorwerte bei Nitroxylverbindungen wenig über zwei.

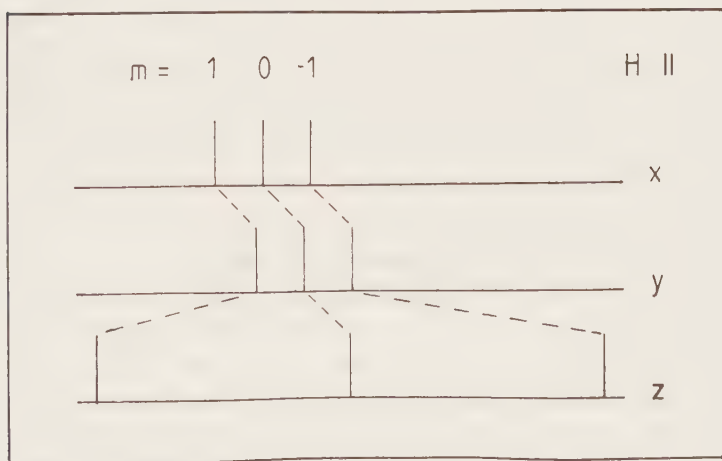


Abb. 1

ESR-Linien einer Nitroxylverbindung (schematisch) im Kristallgitter bei unterschiedlicher Orientierung der Hauptachsen zum äußeren Magnetfeld (H).

Die Anisotropie der Hyperfeinaufspaltung ist (annähernd) axialsymmetrisch, die des g-Faktors nicht (vgl. die $m=0$ Übergänge).

Die ESR-Spektren von Nitroxylen werden wegen der Anisotropie von g und A stark von der Orientierung des molekularen Achsensystems relativ zum äußeren Magnetfeld beeinflusst. Durch Bewegung der Moleküle kommt es zum "Austausch" dieser Molekülorientierungen, der sowohl Breite als auch den Abstand der resultierenden Linien verändert (s.o.). Bei einer intrinsischen Linienbreite von 1 Gauss (ohne Austausch) lassen sich Bewegungen der Spinsonde in einem Zeitbereich von $10^{-10} \text{ s} \leq \tau_r \leq 10^{-7} \text{ s}$ erfassen; dabei bedeutet τ_r die aus der Theorie der Brown'schen Molekularbewegung bekannte Rotationskorrelationszeit. Die Mobilität vieler biologisch aktiver Moleküle kann daher mit Hilfe der Spinlabel-Methode beobachtet werden.

Ein unvermeidlicher Nachteil dieses Vorgehens liegt in der Störung der natürlichen Molekülstruktur durch die sperrige Spinmarkierung, die meist in einen 5- oder 6-gliedrigen Ring eingebaut wird. Manche Enzyme binden solch ein Substrat, ohne es zu spalten (z.B. Na^+, K^+ -ATPase, Streckenbach et al., 1979); andere verarbeiten es mit herabgesetzter Aktivität (Phospholipasen). Weniger spezifische Wechselwirkungen wie die zwischen Phospholipiden und Membranproteinen werden offenbar nicht meßbar beeinträchtigt (Marsh, 1981).

2.3. Saturation Transfer ESR (ST-ESR)

Für manche biochemischen Anwendungen, besonders Untersuchungen an Proteinen, ist eine Erfassung langsamerer Bewegungen erforderlich. Diese wird mit der seit 1975 für Spinsonden entwickelten Saturation Transfer ESR-Methode ermöglicht (Thomas et al., 1975, 1976).

Das damit eröffnete Zeitfenster ist anderen spektroskopischen Methoden schwer zugänglich. Prinzipiell für die Erfassung von Zeiten über 10^{-5} s geeignet wäre die NMR-Spektroskopie, doch gibt es bisher kaum Anwendungen auf die Rotation von Proteinen. Ein Grund hierfür sind sicher die Schwierigkeiten bei der Interpretation der NMR-Spektren von Makromolekülen bzw. bei der spezifischen Markierung (z.B. Deuterierung) von Proteinen. Neuerdings werden verschiedene optische Methoden entwickelt (bzw. weiterentwickelt), von denen hier nur die Phosphoreszenz erwähnt sei. Mit ihrer Hilfe lassen sich Molekülbewegungen im Bereich von Mikro- bis Millisekunden gut untersuchen, da die Lebenszeit der angeregten Chromophore etwa diese Länge hat. Interpreta-

tionsschwierigkeiten gibt es freilich auch hier. Die eigentliche Fluoreszenz hat dagegen ein Zeitfenster von 10^{-9} - 10^{-6} s.

Umbauten am Spektrometer sind für die ST-ESR-Spektroskopie nicht erforderlich, nur der Detektionsmodus ist ein anderer als in der konventionellen ESR-Methodik. Man registriert ein Signal bei um 90° gegen die Feldmodulation verschobenem Phasenwinkel. Bei kleiner eingestrahelter Mikrowellenleistung ist die spektrale Intensität hier gleich Null, was übrigens zur exakten Justierung der Phase vor Aufnahme eines ST-ESR-Spektrum ausgenutzt wird. Bei hoher Leistung tritt partiell Sättigung, d.h. Gleichverteilung der Elektronenspins auf die beiden Energieniveaus ein. Dadurch wird der Zusammenhang zwischen Feldstärke und Absorption nichtlinear. Der Grad der Sättigung hängt bei unbeweglichen Molekülen nur vom Wechselspiel zwischen sättigender Anregung und sättigungsabbauender Relaxation ab. Durch Rotation erfolgt zusätzlich Übertragung der Sättigung ("Saturation Transfer"), d.h. "gesättigte" Radikale entfernen sich aus dem Bereich des Resonanzfeldes und werden durch andere, bereits relaxierte ersetzt (vgl. die Darstellung bei Hemminga, 1983).

Die Sensitivität dieser Methode ist deshalb am größten, wenn die Spin-Gitter-Relaxationszeit, die Modulationsperiode und die Rotationskorrelationszeit in der gleichen Größenordnung liegen: $T_1 \approx \tau_r \approx \omega_m^{-1}$. Da T_1 etwa 10^{-6} - 10^{-5} s beträgt (Percival & Hyde, 1976), können mit der üblichen Modulationsfrequenz von 100 kHz Bewegungen im Mikrosekundenbereich optimal untersucht werden; das insgesamt mit dieser Methode zugängliche Zeitintervall liegt bei 10^{-7} s $< \tau_r < 10^{-3}$ s.

Durch den "Saturation Transfer"-Effekt kommt es zum Erscheinen eines phasenverschobenen Signals, das bei einem Detektionswinkel von 90° rein erhalten werden kann. Dieser Effekt ist in den einzelnen spektralen Regionen verschieden ausgeprägt, da er von der Winkelabhängigkeit der Resonanzfeldstärke abhängt. Wo diese groß ist, wird die Sättigung durch langsame Rotation des Moleküls im Magnetfeld besonders effektiv vermindert.

In der Praxis hat sich die Messung der zweiten harmonischen Oberschwingung im Absorptionsmodus (V_2') am meisten durchgesetzt, da die damit erhaltenen Spektren unempfindlich gegen das Rauschen der Frequenzmodulation sind. Daneben werden auch Dispersionsspektren (U_1)

untersucht, da diese fast ausschließlich, von der interessierenden Rotationskorrelationszeit abhängen; die im V_2 -Modus aufgenommenen Spektren werden hingegen auch von der Mikrowellenleistung und beiden Relaxationszeiten beeinflusst (vgl. Thomas et al., 1976; Hyde & Dalton, 1979).

Da die Simulation von ST-ESR-Spektren noch nicht befriedigend gelungen ist, zieht man zur Auswertung Referenzspektren von Proben heran, deren τ_r -Werte unabhängig berechnet werden können (Thomas et al., 1976; Squier & Thomas, 1986). In der Regel wird Hämoglobin verwendet, in dem ein spinmarkiertes Maleimidderivat spezifisch an beide β -93-Cysteinreste gebunden wurde. Dieses modifizierte Molekül wird in Glycerin/Wasser-Gemischen verschiedener Zusammensetzung und Temperatur untersucht. Die jeweilige Rotationskorrelationszeit läßt sich nach der Gleichung von Debye

$$\tau_r = \frac{4\pi\eta R^3}{3kT} \quad \text{mit } R = 2,9 \text{ nm}$$

errechnen. Nach Aufnahme der ST-ESR-Spektren werden Amplitudenverhältnisse als sog. spektrale Parameter bestimmt und zur Kalibration der Meßmethode gegen τ_r aufgetragen (s. Abb. 4). Die Wahl dieser Amplitudenverhältnisse erfolgt nach Squier & Thomas (1986); der Grundgedanke war dabei, die Intensität einer Region maximaler Empfindlichkeit gegenüber τ_r durch Division durch eine gegenüber τ_r unempfindliche Amplitude zu normieren. Gleichzeitig war darauf zu achten, daß in jedem Spektrum eindeutig lokalisierbare Punkte ausgewählt wurden. Auf diese Weise werden andere Einflüsse auf die spektralen Parameter als der von τ_r möglichst gering gehalten. Statt der Amplitudenverhältnisse können auch Integrale des ganzen Spektrums (Evans, 1981) oder von Teilbereichen (s.z.B. Horvath et al., 1988) berechnet werden, die ebenfalls einer solchen Eichung bedürfen.

Da das Modellsystem isotrope Bewegung zeigt, gilt auch die Kalibration streng nur für diesen Fall. Ergibt die Auswertung der drei üblichen spektralen Parameter eines experimentellen ST-ESR-Spektrums erheblich voneinander abweichende Rotationskorrelationszeiten, so ist dies ein starker Hinweis auf anisotrope Bewegungen der Spinsonde. Die Ableitung einer detaillierten Beschreibung einer anisotropen Bewegung

ist allerdings sehr viel schwieriger. Beth et al. (1983) schlagen hierzu vor, Spektren in verschiedenen Frequenzbändern aufzunehmen, um die Beiträge der Bewegung relativ zu den Hauptachsen auf die spektralen Regionen variieren zu können. Der dazu nötige apparative Aufwand ist aber sehr hoch, so daß es bisher kaum Anwendungen gibt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalien

Triton X-100, Lyso-Phosphatidylcholin, Cardiolipin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidsäure, Carbonyl-Diimidazol, Pyridoxal-5-phosphat, 2,3-Butandion, Hämoglobin, Schlangengift von *Trimeresurus flavoviridis*: Sigma, Taufkirchen bei München

Glyzerin, spinmarkierte Stearinsäurederivate, spinmarkierte Maleimid-derivate: Aldrich, Steinheim

Phospholipase A₂ aus Schweinepankreas, Phospholipase D aus Weißkohl: Boehringer, Mannheim

Ethanolamin (zur Synthese), Ascorbinsäure (p.A.), Stearinsäure (reinst): Merck, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat: Serva, Heidelberg

Lysin (freie Base): Roth, Karlsruhe

Dilyso-Cardiolipin: Avanti, Birmingham, Alabama

Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin wurden aus Eiern isoliert und gereinigt (Ansell & Hawthorne, 1964).

XAD-2-Beads: "Amberlite", Sigma, Taufkirchen

Kieselgel-Platten für Dünnschichtchromatographie: Merck, Darmstadt

Druckdialysemembran: Diaflo PM 30, Amicon, Witten

Dialyseschlauch: Serva, Heidelberg

Zentrifugen

Sorvall, Rotor SS 34 (25000 g)

Phywe, Tischzentrifuge (13000 g)

Christ (2500 g)

Eppendorf, Tischzentrifuge (700 g)

Puffer

Für CAT-Protein: 200 mM NaCl, 10 mM Morpholino-Propansulfonsäure, 50 μ M Ethylendiamin-Tetraessigsäure, 50 μ M NaN₃, pH 7,2

Für ATR-Protein: 100 mM Na₂SO₄, 10 mM Morpholino-Propansulfonsäure, 50 μ M Ethylendiamin-Tetraessigsäure, 50 μ M NaN₃, pH 7,2

Für Rinderherzmitochondrien: 250 mM Saccharose, 10 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan, 50 μ M Ethylendiamin-Tetraessigsäure, 2 mM MgCl₂, pH 7,4

3.2. Analytische Methoden

Die Proteinkonzentration wurde mit der von Helenius & Simons (1972) modifizierten Methode nach Lowry (1951) bestimmt. Die Messung der Konzentration von Triton X-100 erfolgte photometrisch bei 274 nm. Da Pyridoxalphosphat dabei stört, mußte die Triton-Bestimmung vor der Inkubation mit PLP erfolgen.

3.3. Synthesen spinmarkierter Moleküle

Synthese von 12-CLSL

(Okuyama & Nojima, 1965: Enzymatische Spaltung, Cable et al., 1978: Reacylierung)

Bei der enzymatischen Spaltung von Cardiolipin kommt es darauf an, die Reaktion bei maximaler Konzentration des Zwischenproduktes Monolyso-CL zu stoppen. Statt der in der Literatur angegebenen Essigsäure o.ä. eignet sich dazu auch Chloroform, da das Enzym darin inaktiv ist. CHCl_3 ist für die weitere Aufarbeitung ohnehin nötig und läßt sich leicht abdampfen.

20 mg Cardiolipin wurden in 7,5 ml Ethanol gelöst. 2 mg Schlangengift wurden in 400 μl 100 mM Boratpuffer mit 2,5 mM Ca^{++} , pH 7,0 gelöst. Nach Mischung der Reaktanden wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, anschließend mit 3 ml Chloroform gestoppt, bei 25 - 30°C zur Trockne eingedampft und mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt. Dazu wurde der Rückstand in 400 μl Chloroform aufgenommen und auf eine 20x20 cm-Kieselgelplatte mit Schichtdicke 0,25 mm aufgetragen. Die Entwicklung des Chromatogramms erfolgte im Laufmittelsystem Aceton/Chloroform/Methanol/Essigsäure/ Wasser im Volumenverhältnis 8:6:2:2.1, das frisch angesetzt wurde. Nach einer Laufzeit von etwa 90 Minuten wurden rechts und links zwei je 2 cm breite Streifen abgeschnitten und diese der Einwirkung von Joddämpfen etwa 5 Minuten lang ausgesetzt. Nach Anzeichnen auf der Platte wurde der dem Monolyso-Cardiolipin entsprechende Fleck vorsichtig ausgekratzt und zwei- bis dreimal mit dem von Blight & Dyer (1959) angegebenen Medium eluiert; es handelt sich dabei um ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser im Volumenverhältnis 5:10:4, wobei statt Wasser ein Puffer aus 10 mM Ethylendiamin-Tetraessigsäure, pH 7,0, verwendet wurde. Das Kieselgel

wurde jeweils abzentrifugiert. Zu den vereinigten Überständen wurden gleiche Mengen von Chloroform und Puffer gegeben, so daß sich zwei Phasen bildeten; erforderlichenfalls mußte nochmals zentrifugiert werden. Die chloroformreiche Unterphase enthielt jeweils das gewünschte Monolyso-Cardiolipin.

Bei der nun folgenden Umsetzung des Monolyso-CL mit spinmarkierter Fettsäure muß auf Ausschluß von Wasser und Sauerstoff geachtet werden. Daher wurde die beiden Lipide 1 h als Filme im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die spinmarkierte Fettsäure, die im Überschuß einzusetzen war, wurde in 0,5 ml trockenem Benzol gelöst und mit einem Überschuß an Carbonyl-Diimidazol aktiviert. Ob das Benzol genügend getrocknet war, konnte am Auftreten der CO_2 -Bläschen erkannt werden; diese dürfen bei dieser Synthese erst nach Zusammengeben der beiden Reaktanden auftreten. Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurde das Gemisch zum Lyso-CL gegeben. Nach Auflösung des Lipidfilms wurde das Lösungsmittel mit Stickstoff abgeblasen und der trockene Rückstand unter N_2 über Nacht auf 50°C gehalten. Dabei sublimierte das entstandene Imidazol in Form weißer Nadeln an die kühleren Teile des Kolbens. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der Rückstand in $400\ \mu\text{l}$ Chloroform aufgenommen und wie oben dünnschichtchromatographisch gereinigt. Meist bildeten sich polare Nebenprodukte mit hohen R_f -Werten, die wohl durch Oxidation der ungesättigten Fettsäureketten des Cardiolipins entstanden waren. Der R_f -Wert von 12-CLSL lag bei 0,75 und lag damit geringfügig über dem Wert für Rinderherz-Cardiolipin.

Die Ausbeute an 12-CLSL, die über die Spindichte weit genauer als durch Auswiegen bestimmt werden kann, übersteigt selten 1%, bezogen auf Cardiolipin als Ausgangsprodukt. Dabei ist zu beachten, daß in der ersten Stufe grundsätzlich nicht mehr als 30% Monolyso-CL erzielbar sind (vgl. Okuyama & Nojima, 1965).

Die Aufbewahrung des synthetisierten 12-CLSL erfolgte bei -20°C als verdünnte Lösung in Chloroform.

Synthese von 12-PCSL

(Boss et al., 1975)

Diese Synthese verläuft analog zur oben beschriebenen, doch konnte von käuflichem Lyso-PC ausgegangen werden. Da die Gefahr einer Peroxi-

dation beim weitgehend gesättigten Lysolezithin aus Eiern geringer ist als beim hochungesättigten Rinderherz-Cardiolipin, wurde die Reaktionsdauer auf 3 Tage verlängert. Als chromatographisches Laufmittelsystem wurde Chloroform/Methanol/Wasser im Volumenverhältnis von 65/25/4 gewählt. Die Elution der ausgekratzten Kieselgels erfolgte mit Chloroform/Methanol 1:1.

Ein typischer Ansatz umfaßte 15 mg Lyso-PC. In diesem Maßstab konnten Ausbeuten bis zu 20% erreicht werden. Der so dargestellte 12-PCSL diente als Ausgangssubstanz für die Synthese von 12-PASL, 12-PESL und 12-PGSL (s.u.).

Synthesen von 5-PCSL und 16-PCSL

Hierzu wurde Lyso-PC mit 5-SASL bzw. 16-SASL umgesetzt. Sonst wurde nach derselben Vorschrift wie im Fall des 12-PCSL gearbeitet; die Ausbeute an 5-PCSL betrug aber nur 5%. Ein solcher Effekt war zu erwarten, da die sperrige Spinmarkierung hier näher am Reaktionszentrum sitzt.

Synthese von 12-PASL

(Ito & Ohnishi, 1974)

1 mg 12-PCSL wurde in 1 ml Diethylether gelöst. Dazu wurde 1 mg Phospholipase D in 1 ml Acetatpuffer (100 mM, pH 5,6, 20 mM Ca^{++}) gegeben. Das Zweiphasensystem wurde 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei noch zweimal je 1 mg Enzym zugefügt wurden; erforderlichenfalls wurde auch Ether ergänzt. Nach Stoppen der enzymatischen Reaktion durch Zusatz von 30 mg Zitronensäure wurde der Ether abgeblasen und die wässrige Phase zweimal mit je 1 ml Chloroform extrahiert. Nach Waschen der vereinigten Chloroformphasen mit 0,1 M Citratpuffer (pH 5,3) und Wasser wurde auf ca. 400 μl eingengt und mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigt. Das Laufmittelgemisch bestand aus Aceton/Chloroform/Methanol/Essigsäure/Wasser im Volumenverhältnis von 8/6/2/2/1. Der R_f -Wert in diesem System lag bei 0,8.

Trotz eines Umsatzgrades von 100% (auf der Dünnschichtplatte war kein PC mehr nachweisbar) konnten nie mehr als 50% an Reinprodukt isoliert werden.

Synthesen von 5-PASL und 16-PASL

Hierfür war von 5-PCSL bzw. 16-PCSL auszugehen, ansonsten erfolgten die Umsetzungen wie oben beschrieben. Bei 5-PASL wurde nur ein ca. 40%iger Umsatz beobachtet, an gereinigtem Produkt wurden 7% erhalten.

Synthese von 12-PESL

(vgl. die Angaben von Comfurius & Zwaal, 1977, für unmarkierte Lipide)

Beim Kopfgruppenaustausch bei Glycerophospholipiden mittels Phospholipase D sind die Ausbeuten um so höher, je größer die Konzentration des entsprechenden Alkohols gewählt wird. Zu hohe Alkoholkonzentrationen hemmen jedoch das Enzym. Als Nebenprodukt entsteht i.a. Phosphatidsäure.

1 mg 12-PCSL wurden in 1 ml Diethylether gelöst. Nach Auflösung von 1 mg Phospholipase D und 200 μ l Ethanolamin in 800 μ l Acetatpuffer (100 mM, 20 mM Ca^{++}) wurde der pH-Wert mit Essigsäure auf 5,6 eingestellt. (Ethanolamin ist stark alkalisch!)

Die Durchführung der Reaktion sowie die Aufarbeitung erfolgte wie bei der Darstellung von 12-PASL (s.o.). Zur Detektion auf analytischen Dünnschichtplatten diente zusätzlich Ninhydrin-Sprühareagens. Der R_f -Wert in Chloroform/Methanol/Wasser 65/25/4 v/v/v lag bei 0,45.

Es konnten nur 8% an 12-PESL isoliert werden.

Synthese von 12-PGSL

(vgl. Comfurius & Zwaal, 1977)

Auch hier bot sich Kopfgruppenaustausch unter Katalyse von Phospholipase D an. Dabei entsteht das Racemat (Yang et al., 1967).

1 mg 12-PCSL wurde in 1 ml Diethylether gelöst. Dazu kam 1 mg Phospholipase D in 800 μ l Acetatpuffer (0,1 M, 20 mM Ca^{++} , pH 5,5) sowie 1,1 ml wasserfreies Glycerin. Weiter wurde wie bei der Darstellung von 12-PASL vorgegangen. Der R_f -Wert bei der Dünnschichtchromatographie betrug 0,63, die Reinausbeute lag bei 20%.

Synthese von CATSL

Der spinmarkierte Inhibitor CATSL wurde nach prinzipiell ähnlichem Syntheseweg wie die spinmarkierten Phospholipide dargestellt. Dazu wurde nach der Vorschrift von Munding et al. (1983) gearbeitet. Auch

hier erfolgte die Reinigung durch präparative Dünnschichtchromatographie, und die Ausbeute lag mit 4% recht niedrig.

3.4. Probenvorbereitung

Das AAC-Protein wurde in der Regel als CAT-Komplex präpariert (Klingenberg et al., 1979). Proteinproben (0,4 - 0,7 mg/ml) wurde durch Druckdialyse auf Konzentrationen zwischen 2 und 6 mg/ml gebracht. Meist wurde dann der Detergensgehalt durch Adsorption an Polymer-Perlen vermindert. Dazu wurden 10 mg "XAD-2-Beads" pro mg Triton X-100 zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abtrennung des Adsorbens wurde kurz zentrifugiert, um Reste desselben und gegebenenfalls denaturiertes Protein zu entfernen. Nach dieser Behandlung lag die Detergensenkonzentration im Bereich von 1-2 Gew.-%, was etwa einem 300-400-fachen molaren Überschuß über das Protein entspricht.

Spinmarkierte Lipide wurden aus Chloroformlösungen pipettiert und nach Abblasen des Lösungsmittels 10 Minuten im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Diese Lipidfilme wurden nach Zugabe der Proteinprobe (meist 50 - 100 μ l) durch halbstündiges Schütteln solubilisiert; kam es auf rasche Auflösung der Filme an, wurden Glaskügelchen zugefügt und nur 10 Minuten geschüttelt. Auch unmarkierte Lipide wurde als trockene Filme vorgelegt. Eventuelle Zusätze wasserlöslicher Substanzen wurde in gelöster Form zu den Ansätzen pipettiert.

Bei Messungen am spinmarkierten Inhibitor CATSL wurde das Protein als ATR-Komplex isoliert (Aquila & Klingenberg, 1982). Vor Durchführung der Druckdialyse wurde ein geringer Überschuß an CATSL (als Lösung) zugegeben und 30 Minuten inkubiert. Da etwa 90% des überschüssigen Inhibitors während der Druckdialyse entfernt wurden, blieben nur Spuren an freiem CATSL in den Meßproben zurück; eine Beeinträchtigung der ESR-Spektren konnte so vermieden werden.

Rinderherzmitochondrien wurden nach der Vorschrift von Blair (1967) isoliert. Der spinmarkierte Inhibitor CATSL wurde in alkoholischer Lösung zugegeben und 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Da Alkohol die mitochondrialen Membranen angreift, mußte vorher mit Puffer verdünnt werden, um die Ethanolkonzentration unter 5% zu halten. Um eine Reduktion der Spinsonde durch die mitochondriale Atmungskette zu vermeiden, enthielt der Puffer zusätzlich 0,5 mM KCN. Nach der Inkubation wurde

mit 700 g zentrifugiert und noch zweimal mit Puffer gewaschen.

Zur ESR-spektroskopischen Untersuchung wurden die Proben in Glas-kapillaren mit 0,9 mm Innendurchmesser überführt. Kompakte, wasserär-mere Proben wie Mitochondrien und sedimentierte Proteinaggregate wurden in etwas dickeren (1,2 mm) Kapillaren gemessen. Als "Punktproben" gel-ten solche mit Höhen bis zu 5 mm (Fajer & Marsh, 1982), während "Linienproben" 20 mm oder mehr messen und damit den verfügbaren Resona-torraum ganz ausfüllen.

Eine Zentrifugation der abgefüllten Meßproben erfolgte fallweise mit 2500 g bzw. 25000 g jeweils für 10-15 Minuten. Bei der höheren Zentri-fugalbeschleunigung kam es dabei nicht selten zum Bruch der Kapillaren, so daß die niedrigere Geschwindigkeit trotz der schlechteren Sedimen-tierung bevorzugt eingesetzt wurde.

3.5. ESR-Spektroskopie

3.5.1. Konventionelle ESR-Spektroskopie

Geräteeinstellungen

ESR-Spektrometer: Bruker ER 200 D-SRC mit Rechteckresonator TE 102 und Temperiereinheit ER 4111 VT

Magnetfeldstärke: 3360 Gauss $\pm$ 50 Gauss

Mikrowellenfrequenz: 9,4 GHz (X-Band)

Modulationsfrequenz: 100 kHz

Modulationsamplitude: 1 Gauss_{pp}

Mikrowellenleistung: 5 mW

Meßzeit: 100 - 2000 s, meist 500 s

Zeitkonstante meist 0,1% der Meßzeit

Phasenwinkel: 0°

Auswertung der Spektren

Neben dem Ausmessen der Hyperfeinaufspaltung als Maß für die Immo-bilisierung der spinmarkierten Moleküle wurde ein Teil der Spektren wei-ter ausgewertet (s. Abschnitte 4.2., 4.4., 4.5., 4.6., 4.8., 4.9.). Nach Speicherung der nötigenfalls akkumulierten Spektren auf Disketten wurde die Spindichte durch doppelte Integration bestimmt; als Eichpro-ben dienten wässrige Lösungen spinmarkierter Maleimide, die kommerziell erhältlich sind und sich problemlos einwiegen lassen.

Zur Bestimmung des immobilisierten Anteils in Zweikomponentenspektren (vgl. Abschnitt 4.1.) wurden Kontrollspektren von Proben aufgenommen, die sich möglichst nur durch Abwesenheit des Proteins von den auszuwertenden Spektren unterscheiden sollten. Diese wurden ebenfalls gespeichert und zunehmende Anteile davon digital subtrahiert, bis ein Einkomponentenspektrum der immobilisierten Lipidkomponente zurückblieb. Deren Spinkonzentration errechnete sich dann nach

$$c_{\text{imm}} = c_{\text{zus}} - x \cdot c_{\text{mob}} \cdot \frac{V_{\text{mob}}}{V_{\text{zus}}} \quad \text{mit}$$

c_{imm} : Spinkonzentration der immobilen Komponente

c_{mob} : Spinkonzentration der mobilen Komponente

c_{zus} : Gesamte Spinkonzentration in der Proteinprobe

V_{mob} : Relative Geräteverstärkung bei Aufnahme des Kontrollspektrums

V_{zus} : Relative Geräteverstärkung für das zusammengesetzte Spektrum

x : Subtrahierter Bruchteil des Kontrollspektrums.

Um die bei Integration und Festlegung des Subtraktionsendpunktes zwangsläufig auftretenden Fehler nicht unnötig "hochzurechnen", sollten V_{mob} und V_{zus} nicht zu sehr voneinander abweichen.

Bei Vorliegen von Meßreihen standen jeweils mehrere Spektren mit unterschiedlichem Verhältnis der Komponenten zur Verfügung; die Linienform der reinen Komponenten konnte in der Regel als innerhalb einer Meßreihe konstant angenommen werden. Dann bestand die Möglichkeit, mittels Inter-subtraktionen zweier zusammengesetzter Spektren auch Einkomponentenspektren der mobilen Komponente zu gewinnen und so einen weiteren Subtraktionsendpunkt unabhängig festzulegen. Mindestens ein Spektrum der Reihe, in der Regel das mit dem größten immobilisierten Anteil, mußte jedoch zunächst nach der ersten Methode ausgewertet werden, damit eine Berechnung der mobilen Spinkonzentration über Inter-subtraktionen möglich wurde. Beide Ergebnisse sind also nicht vollkommen unabhängig voneinander. Für Inter-subtraktionen zweier zusammengesetzter Spektren 1 und 2 gilt analog zur obigen Gleichung:

$$c_{2,\text{mob}} = c_{2,\text{zus}} - x \cdot c_{1,\text{imm}} \cdot \frac{V_1}{V_2} \quad \text{mit}$$

$$\frac{c_{1,imm}}{c_{1,zus}} > \frac{c_{2,imm}}{c_{2,zus}}$$

3.5.2. ST-ESR-Spektroskopie

Geräteeinstellungen

Modulationsfrequenz: 50 kHz

Modulationsamplitude: 5 Gauss_{pp}

Mikrowellenleistung $\approx$ 25 mW (Sättigungspunkt, s.u.)

Meßzeit: 500 - 2000 s

Zeitkonstante: 0,1 - 0,25% der Meßzeit

Phasenwinkel: 90°

Übrige Einstellungen wie für die konventionelle ESR-Spektroskopie angeben (Abschnitt 3.5.1)

Aufnahme der Spektren

Vor Aufnahme eines ST-ESR-Spektrums war zunächst der sog. "Sättigungspunkt" ("Saturation Point" nach Evans, 1981) zu bestimmen. Dazu wurden V_1 -Spektren der Probe bei verschiedenen nominaler Mikrowellenleistung aufgenommen und anschließend die Signalamplitude gegen die Quadratwurzel aus der eingestellten Leistung aufgetragen. Die so erhaltene Kurve (ein Beispiel zeigt Abb. 2) verläuft bei niedriger bzw. sehr hoher Leistung jeweils linear. Das von Schnittpunkt beider Tangenten auf die Abszisse gefällte Lot trifft den gesuchten Sättigungspunkt.

Da die Leistung des verwendeten Spektrometers nur in Stufen verstellbar war, mußte gerundet werden; in Zweifelsfällen wurden zwei Spektren aufgenommen. Durch dieses von Evans (1981) vorgeschlagene Verfahren erspart man sich die nicht ganz einfache Kalibration des Mikrowellenfeldes (vgl. hierzu Squier & Thomas, 1986a). In der vorliegenden Arbeit wurde allgemein eine Zunahme der zur Sättigung erforderlichen Leistung mit ansteigender Temperatur festgestellt.

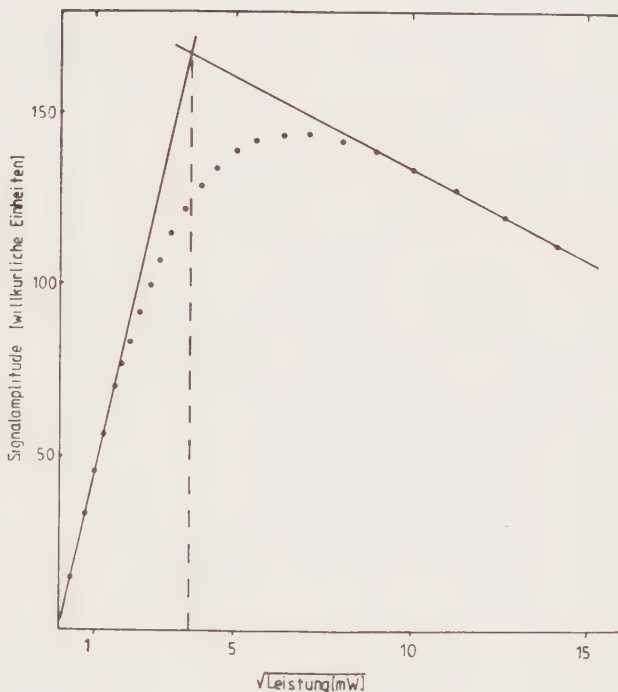


Abb. 2

Graphische Bestimmung des "Sättigungspunktes" vor Aufnahme eines ST-ESR-Spektrums.

V_1 -Spektren werden bei unterschiedlicher Mikrowellenleistung aufgenommen und deren Amplitude gegen die Quadratwurzel aus der nominalen Leistung aufgetragen. Der Schnittpunkt der verlängerten linearen Kurvenabschnitte ergibt den gesuchten Sättigungspunkt.

Nach der Bestimmung der nötigen Leistung war noch die Phaseneinstellung zu justieren. Dazu wurde das Verschwinden des V_2' -Signals bei kleiner Leistung ($P \leq 1$ mW) ausgenutzt. Der zentrale Teil des Spektrums wurde bei zu kleinem und zu großem Phasenwinkel aufgenommen und die korrekte Einstellung durch lineare Interpolation der Signalamplitude ermittelt (Hemminga, 1983). Im Gegensatz zu den Angaben von Poore et al. (1982) trat beim verwendeten Gerät eine langsame Phasendrift auf, so daß die Justierung jedesmal zu wiederholen war. Bis auf die Mikrowellenleistung wurden dabei alle Geräte-Einstellungen so belassen, wie zur Aufnahme des ST-ESR-Spektrums erforderlich bzw. vorgesehen.

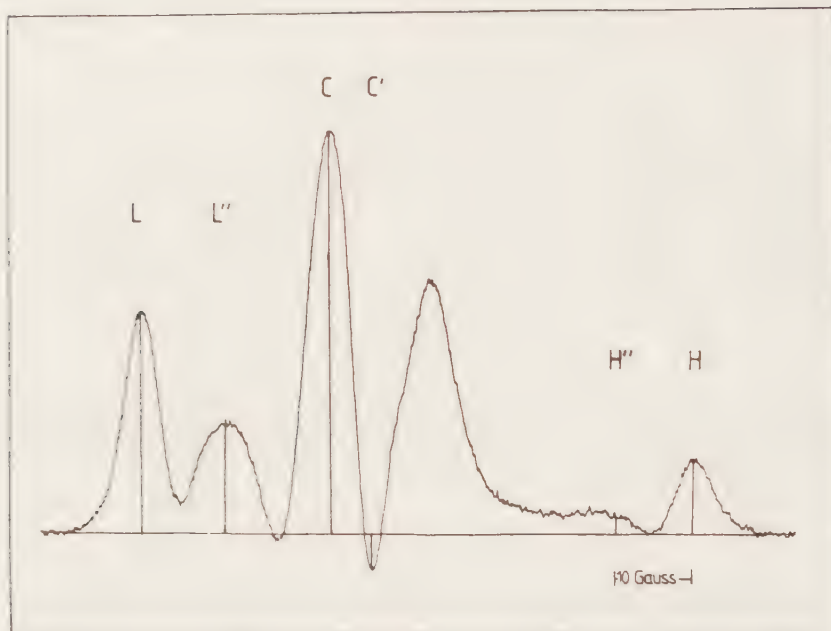


Abb. 3

Definition der spektralen Parameter an ST-ESR-Spektren.

Das Spektrum zeigt spinmarkiertes Hämoglobin in 80%igem Glycerin bei 5°C. Als "spektrale Parameter" bezeichnet man die Amplitudenverhältnisse L''/L , C'/C und H''/H .

Auswertung der Spektren

Zur Auswertung wurden die von Thomas et al. (1976) eingeführten spektralen Parameter (Amplitudenverhältnisse) herangezogen. In Übereinstimmung mit der Literatur werden sie nach den Feldregionen als L''/L , C'/C und H''/H bezeichnet. Während L'' , L , C' , C und H durch Extrema im Spektrum definiert sind, wird die Amplitude H'' bei gegenüber H um 10 Gauss niedrigerem Magnetfeld gemessen (s. Abb. 3).

Zur Kalibration wurden ST-ESR-Spektren von spinmarkiertem Hämoglobin (Boeyens & McConnell, 1966) bei unterschiedlicher Viskosität η und Temperatur T aufgenommen und ausgewertet; die Rotationskorrelationszeiten ergeben sich nach

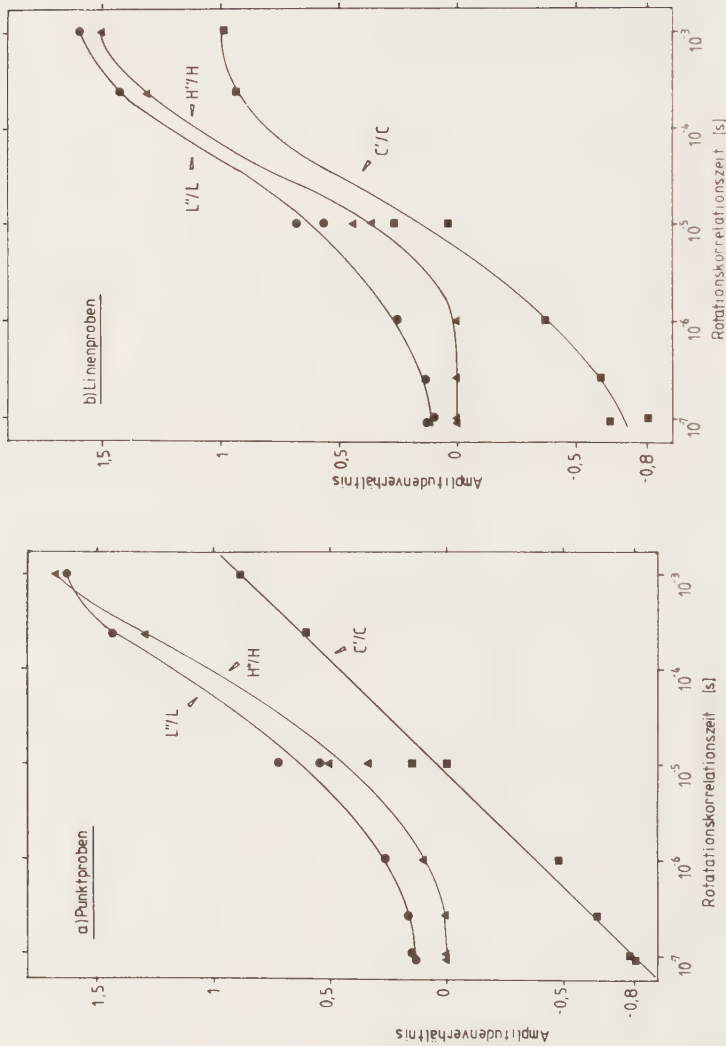
$$\tau_r = \frac{4\pi\eta R^3}{3kT} \quad \text{mit}$$

$R_{Hb} = 2,9 \text{ nm}$. Es wurden die von Thomas et al. (1976) sowie Squier & Thomas (1986a) verwendeten Kombinationen reproduziert, um auf eigene Messungen der Viskosität verzichten zu können (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: *Meßbedingungen für die Kalibrationsspektren zur ST-ESR-Spektroskopie*

Vol.-% Glyzerin	Temperatur [K]	τ_r [s]
40	278	$9 \cdot 10^{-8}$
50	303	$1 \cdot 10^{-7}$
40	268	$2,6 \cdot 10^{-7}$
60	278	$1 \cdot 10^{-6}$
69	261	$1 \cdot 10^{-5}$
80	278	$1 \cdot 10^{-5}$
90	261	$2,3 \cdot 10^{-4}$
95	253	$1 \cdot 10^{-3}$

Zur Erstellung der Eichkurven (Abb. 4) wurden die drei spektralen Parameter jeweils gegen $\lg \tau_r$ aufgetragen; für Punktproben (Höhe der Flüssigkeitssäule $\leq 5 \text{ mm}$) und Linienproben (20 - 30 mm) wurden getrennte Kalibrationskurven aufgestellt. Abweichend von Literaturangaben ergab sich für C'/C bei Punktproben ein linearer Verlauf (s. Abb. 4 a).

**Abb. 4**

Kalibrationskurven für die ST-ESR-Spektroskopie.

Die in Abb. 3 demonstrierten spektralen Parameter (Amplitudenverhältnisse) wurden gegen den Logarithmus der berechneten Rotationskorrelationszeit des Hämoglobinmoleküls aufgetragen.

a) "Punktproben": Höhe der Flüssigkeitssäule (5 mm, Probe im Zentrum des Magnetfeldes.

b) "Linienproben": Höhe der Flüssigkeitssäule (20 mm, Probe füllt den Resonator aus.

4. Ergebnisse

4.1. Zur Wahl der geeignetsten Spinmarkierung für Phospholipide

Eine Spinsonde (4,4-Dimethyl-3-oxazolidinyloxy- oder "doxyl"-Gruppe) kann prinzipiell an jedem Kohlenstoffatom einer Fettsäurekette angebracht und dann in Phospholipide eingeführt werden. Käuflich sind substituierte Stearinsäuren mit Spinmarkierung am 5., 7., 12., und 16. C-Atom. Das in 12-Position spinmarkierte Derivat kann relativ leicht aus dem Naturprodukt 12-Hydroxy-Stearinsäure synthetisiert werden (Fransen-Zeilstra & Wara, 1985).

Je größer der Abstand zwischen Spinsonde und polarer Kopfgruppe ist, desto schmalere Linien werden im ESR-Spektrum beobachtet, wenn das markierte Molekül in eine Membran oder Detergensemizelle eingebaut wird. Das liegt daran, daß ein Großteil der Anisotropie des g- und des A-Tensors durch die Molekülbewegung herausgemittelt wird (s. Abschnitt 2.2.). Gleichzeitig läßt sich eine Immobilisierung des Moleküls anhand der Linienformänderung besonders empfindlich erfassen. Eine teilweise Immobilisierung der Spinsonden einer Probe macht sich durch das Auftreten zweier spektraler Komponenten bemerkbar (s. Marsh, 1985), die im Tieffeldbereich am besten aufgelöst sind. Dabei entspricht die Komponente mit größerer Hyperfeinaufspaltung den immobileren Molekülen.

Andererseits ist am Ende der Kohlenwasserstoffkette ein von der Kopfgruppe ausgehender spezifischer Immobilisierungseffekt aufgrund der vielen zwischengeschalteten Einfachbindungen stark abgeschwächt. Für Untersuchungen der "boundary layer" integraler Membranproteine haben sich besonders am 14. Kohlenstoffatom substituierte Lipide bewährt (Marsh et al., 1982), deren Darstellung allerdings sehr aufwendig ist.

Im Mizellären System Triton X-100/H₂O, das in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich untersucht wurde, sind die beobachtbaren Linien der ESR-Übergänge breiter als in Phospholipidmembranen bei gleicher Temperatur. Vor Beginn der eigentlichen Messungen mußte daher zunächst die für den Zweck der Arbeit geeignetste Position der Spinmarkierung ermittelt werden. Die kommerziell erhältlichen, an der 5-, 12- und 16-Position spinmarkierten Fettsäuren wurden zu den entsprechenden Phosphatidsäuren umgesetzt (s. Methoden), und in Gegenwart des solubilisierten AAC-Proteins bei verschiedenen Temperaturen ESR-spektroskopisch untersucht. Im

Fall von 12-PASL traten im Temperaturbereich von etwa 20-40°C Zweikomponentenspektren auf (s. Abb. 5), bei 16-PASL nur unterhalb von 10°C; 5-PASL lieferte stets Einkomponentenspektren. Da Temperaturen um 30°C dem physiologischen Wert näherkommen als solche von 0-10°C, wurden für die eingehenderen Untersuchungen (Abschnitt 4.2-4.10.) nur noch die am 12. C-Atom der sn₂-Fettsäurekette spinmarkierten Phospholipide eingesetzt.

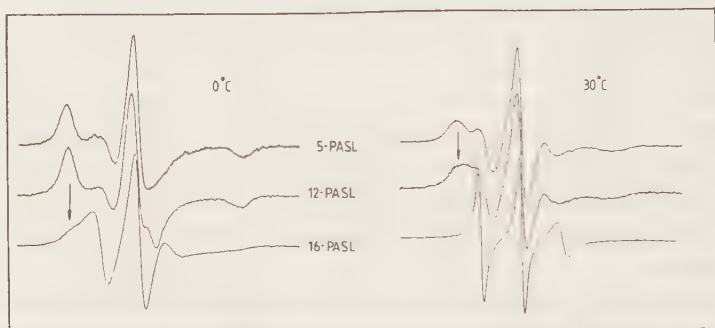


Abb. 5

ESR-Spektren von spinmarkierter Phosphatidsäure in Gegenwart des solubilisierten AAC-Proteins. Abhängigkeit der Linienform von Temperatur und Sitz der Spinmarkierung.

In Triton X-100 solubilisiertes AAC-Protein (4 mg/ml) wurde mit Filmen der drei spinmarkierten Phosphatidsäurederivate inkubiert (PASL/Protein = 0,8 mol/mol). Die erhaltenen ESR-Spektren wurden auf gleiche Maximalamplitude normiert. Bei Spinmarkierung am 12. C-Atom der sn-2-Fettsäurekette treten bei 30°C, bei Markierung am 16. C-Atom bei 0°C Zweikomponentenspektren auf. Die Pfeile weisen jeweils auf das Tieffeldsignal der durch Wechselwirkung mit dem Protein immobilisierten Lipidkomponente.

An 5-PASL und 5-PCSL wurden zusätzlich ST-ESR-Messungen vorgenommen, um quantitative Aussagen über die effektive Rotationskorrelationszeit der immobilisierten Phospholipidmoleküle zu erhalten (s. Abschnitt 4.12.). Im Gegensatz zur konventionellen ESR-Spektroskopie sind bei dieser Methode Zweikomponentenspektren unnötig und erschweren sogar erheblich die Auswertung.

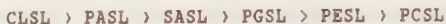
5.2. Lipid-Selektivität des solubilisierten ADP/ATP-Translokators

In natürlichen (z.B. Marsh et al., 1981; Esmann et al., 1985) und rekonstituierten (z.B. Powell et al., 1987) Membranen ist die Selektivität integraler Membranproteine für bestimmte Lipide mehrfach mit Hilfe der Spinlabel-Methode untersucht worden (vgl. Einleitung). An solubilisierten Proteinen wurden solche Untersuchungen bisher selten angestellt (Gwak & Powell, 1982). Da der AAC im nichtionischen Polyoxyethylen-Detergens Triton X-100 isoliert wird (Klingenberg et al., 1979) und darin stabil ist, erschien es sinnvoll, zunächst in diesem (artificialen) System seine Lipidselektivität zu prüfen.

Daß eine solche Selektivität zu vermuten war, ergab sich u.A. aus der Tatsache, daß das in der üblichen Weise gereinigte AAC-Protein größere Mengen Cardiolipin (CL), dagegen nur wenig Lecithin (PC) und Cephalin (PE) enthält (Beyer & Klingenberg, 1985). Im Detergenssystem läßt sich die "Bindung" bestimmter Lipide durch das AAC-Protein besser studieren als vor dem Hintergrund anderer Phospholipide. Z.B. wären die in Abschnitt 4.3. beschriebenen Verdrängungsversuche in Membranpräparationen nicht für alle Lipide durchführbar gewesen, da das membranbildende Lipid (meist PC), das stets in hohem Überschuß vorliegt, nicht ohne weiteres in die Reihenfolge eingeordnet werden könnte.

Eine Probe des solubilisierten CAT-AAC-Komplexes wurde in mehrere Aliquots aufgeteilt und diese mit gleichen molaren Mengen der sechs spinmarkierten Lipide inkubiert. ESR-Spektren dieser Proben wurden bei 30°C akkumuliert und gespeichert. An dem ausgeprägten Buckel im Tieffeldbereich der Spektren von Cardiolipin und Phosphatidsäure ist qualitativ erkennbar, daß ein Großteil der beiden spinmarkierten Lipide immobilisiert ist (Abb. 6a). Auch die spinmarkierte Fettsäure (12-SASL) zeigt ein deutliches Zweikomponentenspektrum, wogegen im Spektrum des 12-PCSL eine immobilisierte Komponente nicht deutlich aufgelöst ist.

Für die Affinität der untersuchten Lipide zum AAC-Protein läßt sich somit schon qualitativ die Reihe



aufstellen.

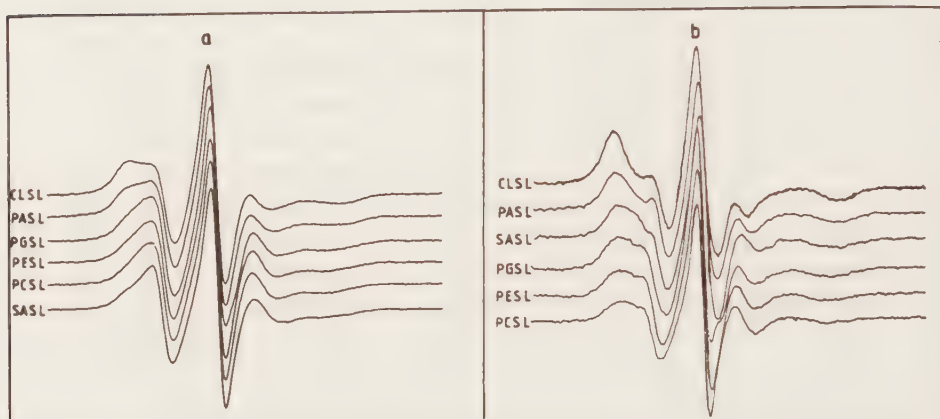


Abb. 6

Lipid-Selektivität des solubilisierten AAC-Proteins.

Eine Probe von 5,2 mg/ml AAC-Protein in 2,6 Gew.-% Triton X-100 wurde aufgeteilt und mit Filmen der spinmarkierten Lipide inkubiert. Das Molverhältnis von Lipid zu Protein betrug 1,4.

a) ESR-Spektren dieser Probe bei 30°C.

b) Spektren der jeweils immobilisierten Lipidkomponente nach Subtraktion von Spektren der entsprechenden spinmarkierten Lipide in Triton X-100 bei 30°C. Man erkennt deutlich die unterschiedliche Linienform und die von oben nach unten abnehmende Hyperfeinaufspaltung.

Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurde von jedem Spektrum ein Spektrum einer proteinfreien Vergleichsprobe bis zum jeweiligen Endpunkt (s. Methoden) subtrahiert; der resultierende, durch den Einfluß des Proteins in seiner Bewegung eingeschränkte Bruchteil der Lipidmoleküle (sein Spektrum zeigt Abb. 6b) war je nach der Kopfgruppe verschieden groß (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Lipid-Selektivität des solubilisierten AAC-Proteins
vgl. Abb. 6

Spinmarkiertes Lipid	Mol-% immobilisiert	K _{rel}
12-CLSL	64	10,0
12-PASL	63	9,6
12-SASL	47	5,0
12-PGSL	43	4,3
12-PESL	28	2,2
12-PCSL	15	1,0

Beim hier angewendeten Subtraktions- und Integrationsverfahren beträgt der Fehler erfahrungsgemäß $\pm 5\%$, bezogen auf die gesamte Spinkonzentration einer Probe.

Die erhaltenen Zahlenwerte stimmen mit der qualitativ beobachtbaren Selektivitätsreihe überein, obwohl bei qualitativer Beurteilung der Spektren der Unterschied zwischen CLSL und PASL mehr als 1% zu betragen scheint. Diese scheinbare Diskrepanz kann aber mit der unterschiedlichen Linienform der immobilisierten spektralen Komponenten der beiden Phospholipide erklärt werden (s.u.).

Interpretiert man die immobilen Lipidmoleküle in der üblichen Weise als an die Proteinoberfläche "gebunden", so lassen sich auch hier relative, auf das am schwächsten bindende Phosphatidylcholin bezogene Bindungskonstanten errechnen (K_{rel} in Tabelle 2). Auf rekonstituierte Membranen ist dieser Auswertungsmodus bereits mehrfach angewendet worden (Marsh, 1981). Er beruht auf der Annahme des Gleichgewichtes



für die Verdrängung eines markierten durch ein unmarkiertes Lipidmolekül von einer Bindungsstelle an einem Membranprotein. (Diese Verdrängung kann jedoch nicht unmittelbar beobachtet werden.) Bei Vernachlässigung der Aktivitätskoeffizienten lassen sich bei geringer Konzentration des markierten Lipids relative Bindungskonstanten definieren:

$$K_{\text{rel}} = \frac{n_b^*}{n_f^*} \cdot \left\{ \frac{n_t}{n} - 1 \right\} \quad \text{mit}$$

n , Zahl der Bindungsplätze; n_t , Lipid/Protein (mol/mol); n_b^* und n_f^* , gebundenes und freies markiertes Lipid. Unter der Annahme gleicher Affinitäten der Bindungsstellen für markierte und unmarkierte Lipide einer Klasse läßt sich K_{rel} allein aus den aus ESR-Messungen erhältlichen immobilisierten Anteilen des untersuchten Lipids und von PCSL berechnen:

$$K_{\text{rel}} = \frac{n_b(\text{Lipid})}{n_f(\text{Lipid})} \cdot \frac{n_f(\text{PCSL})}{n_b(\text{PCSL})}$$

Man erhält so eine "effektive" (gemittelte) Bindungskonstante für alle Bindungsstellen am Protein (s. Diskussion).

Zur Berechnung der in Tabelle 2 angegebenen relativen Bindungskonstanten wurde zunächst für alle Proben das Molverhältnis von immobilisiertem zu mobilem Lipid bestimmt und anschließend durch den für 12-PCSL erhaltenen Wert dividiert.¹ Die so erhaltenen Bindungskonstanten unterscheiden sich maximal gerade um eine Größenordnung. Auch diese Werte sind nur dann aussagekräftig, wenn alle Lipide um dieselben Bindungsstellen konkurrieren.

Auch der Grad der Immobilisierung ist für die Kopfgruppe der Lipide spezifisch, wie man aus den nach vollständiger Subtraktion der mobilen Komponente zurückbleibenden Restspektren erkennen kann (s. Abb. 6b). Die Hyperfeinaufspaltung betrug im Fall des Cardiolipins 57 Gauss, bei Phosphatidylcholin waren es nur noch 52 Gauss. Selbstverständlich änderten sich damit auch Linienform und -breite. Diese Unterschiede erschwerten naturgemäß die Erkennung des Subtraktionsendpunktes; einige

¹Da die spinmarkierten Lipide hier nicht mit unmarkiertem Phosphatidylcholin, sondern mit Detergens um Plätze auf der Proteinoberfläche konkurrieren, wäre es wünschenswert gewesen, die Bindungskonstante von Triton X-100 als Einheit zu wählen. Dazu wäre eine Spinmarkierung am Detergens benötigt worden, deren Synthese zwar beschrieben wurde (Roman & Keana, 1982), aber sehr aufwendig ist. Darüber hinaus konnte nicht unbedingt davon ausgegangen werden, daß mit dieser Spinsonde Zweikomponentenspektren zu erhalten sind, denn der Austausch der Detergensmoleküle erfolgt sicherlich noch schneller als der von Phospholipiden.

Willkür war dabei nicht zu vermeiden, denn nachdem sich herausgestellt hatte, daß die Endpunktsspektren der verschiedenen markierten Lipide nicht identisch waren, mußte der Endpunkt für jedes Lipid gesondert bestimmt werden. Die oben angegebene Reihe der Lipid-Selektivität wird durch diese Schwierigkeit aber nicht in Frage gestellt. Ohne die hier vorgenommene Berücksichtigung dieses Effektes wären die Unterschiede vielmehr noch deutlicher ausgefallen.

In der ESR-Literatur über rekonstituierte Membranen wird auf dieses Problem offenbar bisher nirgends eingegangen (s. Diskussion).

4.3. Verdrängung der spinmarkierten, proteingebundenen Lipidmoleküle durch unmarkierte Lipide

Zur Unterstützung der Selektivitätsreihe der Lipide wurde eine Reihe von Experimenten zur Konkurrenz zwischen spinmarkierten Lipiden und unmarkierten Analoga durchgeführt. Findet eine Verdrängung statt, so muß sich diese auf das ESR-Spektrum dadurch auswirken, daß das Verhältnis von immobilisierter zu mobiler Komponente abnimmt (am besten sichtbar im Tieffeldbereich).

Folgender Versuchsablauf wurde allgemein eingehalten: Eine konzentrierte Proteinprobe (ca. 5 mg/ml), deren Detergensgehalt auf etwa 300-500 mol Triton X-100/mol Protein vermindert worden war, wurde zunächst mit einem Film des gewünschten spinmarkierten Lipids inkubiert; das Molverhältnis Spinsonde/Protein betrug dabei ungefähr 1:1. Unter diesen Bedingungen ist der Anteil an immobilisiertem Lipid hoch und das Signal/Rausch-Verhältnis akzeptabel, während Proteinaggregation (s. Abschnitt 4.10.) vermieden wird. Das zugehörige ESR-Spektrum, das den Grad der Bindung des spinmarkierten Lipids an das Protein ohne Konkurrenz anderer Lipide anzeigt, wurde jeweils zum Vergleich herangezogen. Die Probe wurde dann aufgeteilt und die einzelnen Portionen zu trockenen Filmen unmarkierter Lipide gegeben. In einer Versuchsreihe konnte so die Verdrängung des spinmarkierten Lipids durch unterschiedliche Mengen desselben unmarkierten Konkurrenten (Methode a) oder durch gleiche molare Mengen verschiedener Lipide (Methode b) geprüft werden. In jedem Fall wurden ESR-Spektren mit gleichen Geräteeinstellungen wie beim Kontrollspektrum aufgenommen und qualitativ im Hinblick auf die Verdrängungseffektivität beurteilt. Auf eine Quantifizierung der

Effekte wurde hier verzichtet, da es nach Zusatz größerer Lipidmengen zum Triton-solubilisierten AAC zu einer erheblichen Verschmälerung der ESR-Linien kommt; eine Subtraktion des mobilen Anteils ist daher nicht ohne weiteres möglich. Auch das Ausmessen von Amplituden führt hier nicht weiter, da die die Linienformänderung verursachenden mikroskopischen Vorgänge in den gemischten Mizellen unbekannt sind.

Derartige Reihenuntersuchungen wurden besonders mit Cardiolipin durchgeführt, da dieses Phospholipid besonders gut an den AAC bindet und somit große Effekte zu erwarten waren; außerdem kommt es, wie bereits erwähnt wurde, in der natürlichen Umgebung dieses Proteins vor, was weder für Phosphatid- noch für Stearinsäure zutrifft. Insgesamt wurde das Kompetitionsverhalten folgender Paare von Lipiden untersucht:

Tabelle 3: Übersicht über die Versuche zur Verdrängung
proteingebundener, spinmarkierter Lipide

Kompetitor →	CL	Dilyso-CL	PA	SA	PG	PE	PC
Spinmarkiertes Lipid ↓							
12-CLSL	a,b	b	a,b	a,b	b	b	a,b
12-PASL	a	-	-	-	-	-	-
12-SASL	a,b	-	-	-	-	-	-

In allen Fällen wurde eine Abnahme der immobilisierten spektralen Komponente mit zunehmender Konzentration des unmarkierten Lipids beobachtet, wenn auch in sehr unterschiedlichem Ausmaß (s. Abb. 8). Das zeigt eindeutig, daß markierte und unmarkierte Lipidmoleküle um dieselben Plätze auf der Proteinoberfläche konkurrieren, diese "Bindung" also kein durch die Spinmarkierung hervorgerufenen Artefakt ist. Dieser in der Literatur (z.B. von Chapman, 1982) gelegentlich geäußerte Verdacht kann mit Membranpräparationen nicht so unzweideutig entkräftet werden.

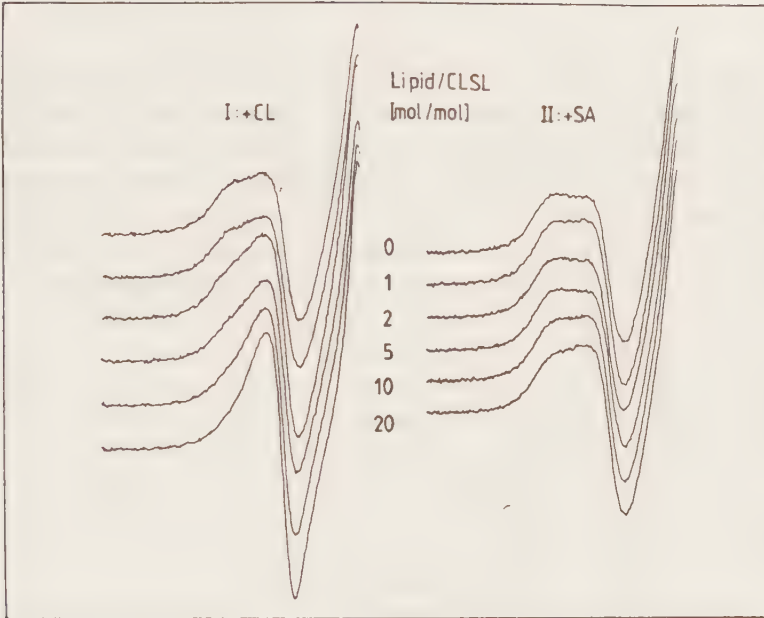


Abb. 7

Verdrängung von proteingebundenem 12-CLSL durch Cardiolipin bzw. Stearinsäure, Experimente nach Methode a).

- I) 2,7 mg AAC-Protein/ml in 2,1 Gew.-% Triton X-100 wurden mit einem doppelten molaren Überschuß an 12-CLSL inkubiert (oberstes Spektrum). Die angegebenen molaren Überschüsse von CL über CLSL wurden jeweils als trockene Filme vorgelegt. Man erkennt deutlich die stufenweise Abnahme der immobilisierten Lipidkomponente.
- II) Analoger Versuchsablauf mit 5,3 mg/ml Protein, 2,7 Gew.-% Triton und CLSL/Protein = 1,9 mol/mol. Daher wurde anfänglich ein höherer Anteil der Spinsonde immobilisiert als in Reihe I. Die zugegebene Fettsäure verdrängt nur wenig CLSL, da die immobilisierte Komponente bis zuletzt deutlich bleibt.

Alle ESR-Spektren wurden bei 30°C unmittelbar nach Auflösung der Lipidfilme aufgenommen.

Die Verdrängung von 12-CLSL durch Cardiolipin ist zwar recht eindrucksvoll (s. Abb. 7). Ein Vergleich der beiden ersten Spektren in Abb. 7 I läßt allerdings vermuten, daß weniger gebundener 12-CLSL verdrängt wurde, als bei vollständiger Gleichgewichtseinstellung zu erwarten wäre (50% bei Äquimolarität). Auf diesen Punkt wird im Diskussions- teil ausführlich eingegangen. Die Stearinsäure erwies sich als

ausgesprochen schwacher Kompetitor, denn selbst ein zwanzigfacher molarer Überschuß über 12-CLSL hatte fast keinen Einfluß auf das ESR-Spektrum. Umgekehrt konnte dagegen gezeigt werden, daß proteingebundene, spinmarkierte Stearinsäure durch Cardiolipin wirksam verdrängt wird (ohne Abb.).

Zur Vervollständigung dieser Untersuchungen wurden auch die schwach bindenden Phospholipide PG, PE und PC sowie Dilyso-CL, von dem kein

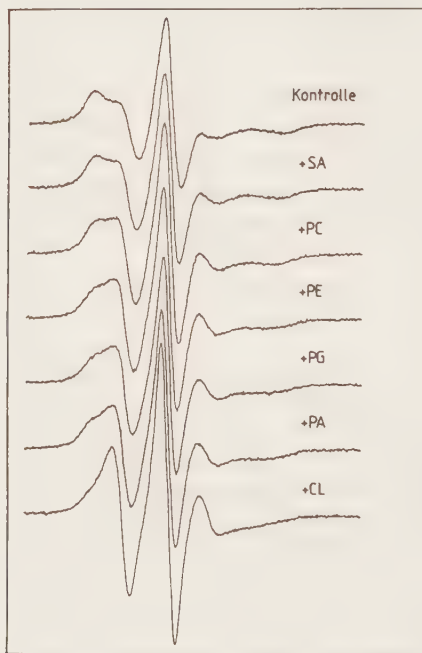


Abb. 8

Verdrängung von 12-CLSL durch unmarkierte Lipide, Versuchsablauf nach Methode b

Eine Probe von 4 mg AAC/ml in 1,1 Gew.-% Triton X-100 wurde mit 1,8 mol 12-CLSL/mol Protein inkubiert (Kontrolle). Filme der angegebenen Lipide wurden durch Aliquots dieser Probe solubilisiert, so daß jeweils ein 20-facher molarer Überschuß des unmarkierten über das spinmarkierte Lipid vorlag. Die Wirkung der verschiedenen Kompetitoren ist daher direkt vergleichbar.

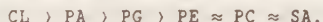
Die ESR-Spektren wurden bei 30°C aufgenommen.

spinmarkiertes Derivat erhältlich ist, einbezogen. Dabei wurde nach Methode b verfahren (s.o.). Um miteinander vergleichbare Spektren zu gewinnen, wurden mit CLSL "beladene" AAC-Proben gleicher Protein- und Detergensenkonzentration mit einem jeweils 20-fachen molaren Überschuß der Lipide inkubiert (s. Abb. 8). Auch hier ergaben sich erhebliche Unterschiede in der Fähigkeit zur Verdrängung von 12-CLSL von der Oberfläche der AAC-Proteins.

So läßt sich eine Reihenfolge



aufstellen, die bezüglich der Stellung der Fettsäure von der Reihenfolge der Bindungselektivität (vgl. Abb. 6) abweicht. Eine analoge Reihe von Spektren wurde auch zur Verdrängung von 12-SASL aufgenommen; da diese spinmarkierte Fettsäure eine geringere Affinität zum AAC aufweist, wurde hier nur ein zehnfacher Überschuß der unmarkierten Lipide verwendet. Es ergab sich im wesentlichen die gleiche Rangfolge



Der Verdrängungseffekt durch die Fettsäure erwies sich also auch in diesem Fall als schwach, obwohl ihr spinmarkiertes Analogon SASL im Detergens Triton X-100 in Abwesenheit anderer Lipide eine deutliche Proteinbindung erkennen läßt (vgl. Abb. 6). Für Fettsäuren spezifische Bindungsplätze scheinen demnach nicht zu existieren (s. Diskussion).

4.4. Einfluß der Salzkonzentration auf die Lipidbindung des solubilisierten AAC-Proteins

Wegen der bevorzugten Bindung der doppelt negativ geladenen Phospholipide CL und PA (s. Abschnitt 4.2) lag die Vermutung nahe, daß elektrostatische Anziehung zwischen Phosphat- und Aminogruppen beim Zustandekommen dieser Lipid-Protein-Wechselwirkung eine Rolle spielt. Zur experimentellen Prüfung boten sich drei Zugänge an. Eine elektrostatische Kraft zwischen zwei Teilchen läßt sich durch Kompensation einer der beiden Ladungen aufheben. Eine solche Entladung ist im vorliegenden Fall am einfachsten durch eine Protonierung bzw. Deprotonierung der Phosphat- bzw. Aminogruppen mittels pH-Änderung möglich (s. Abschnitt 4.5.). Auch einige der bekannten chemischen Reaktionen zur Modifizierung basischer Aminosäure-Seitenketten führen zu deren Ent- oder Umladung (s. Abschnitt 4.9). Schließlich werden elektrostatische

Kräfte in Lösungen durch eine hohe Ionenkonzentration abgeschirmt und verlieren damit an Wirksamkeit.

Zunächst wurde der Einfluß der Ionenstärke auf die Protein-Lipid-Wechselwirkungen des solubilisierten AAC-Proteins untersucht. Eine Probe des CAT-AAC-Komplexes (4,6 mg Protein/ml, 340 mol Triton X-100/mol Protein) wurde mit festem Salz auf eine Konzentration von 1 M NaCl gebracht. Aliquots davon wurden mit gleichen Mengen der verschiedenen spinmarkierten Lipide inkubiert und jeweils bei 30°C ESR-Spektren aufgenommen. Gegenüber einer vergleichbaren Meßreihe bei 0,2 M NaCl nahm bei allen Lipiden der Anteil der immobilisierten Komponente ab; die Reihenfolge der Selektivität blieb, soweit noch erkennbar, erhalten.

In weiteren Versuchsreihen wurde dieser Effekt quantifiziert. Eine Proteinprobe (5,5 mg/ml, 2,2 Gew.-% Triton X-100) wurde aufgeteilt und mit 12-CLSL, 12-PASL und 12-SASL inkubiert. Dabei lag das Lipid/Protein-Verhältnis unter 1 mol/mol, um ein hohes Maß an Bindung zu erhalten. Nach Aufnahme der ESR-Spektren bei 30°C wurde festes NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M zugegeben, dann durch Dialyse (12 h) alles NaCl entfernt und zuletzt wieder gegen den Standardpuffer mit 0,2 M NaCl dialysiert, um die Umkehrbarkeit des Effektes zu prüfen. Bei jeder Salzkonzentration wurde ein ESR-Spektrum aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mittels Subtraktion von Kontrollspektren sowie mittels Inter-subtraktionen (s. Methoden). Tabelliert sind (Tab. 4) Mittelwerte für den Prozentsatz der gebundenen Komponente. Bei hohem Salzgehalt (1M) zeigte sich eine deutliche Linienformänderung, besonders bei der spinmarkierten Fettsäure. Hier dürfte sich auch das Verteilungsgleichgewicht der Fettsäure zwischen Tritonphase und wässriger Phase durch "Aussalzen" verschoben haben. Obwohl sich die Tieffeldlinie der mobilen Komponente nur um 1/3 Gauss verbreiterte, war nämlich eine saubere Subtraktion nicht mehr möglich. Daher war hier die Verwendung eines besonderen Kontrollspektrums in 1 M NaCl-Puffer erforderlich, um ein brauchbares Differenzspektrum zu erhalten.

Tabelle 4: Einfluß der NaCl-Konzentration auf den gebundenen Anteil dreier spinmarkierter Lipide. Die Prozentwerte beziehen sich auf die gesamte Spinkonzentration in jeder Probe.

Spinsonde	Lipid/Protein [mol/mol]	% gebundenes Lipid in			
		0,2 M	1 M	0 M	0,2 M NaCl
12-CLSL	0,73	62	54	65	56
12-PASL	0,56	70	60	77	57
12-SASL	0,42	48	44	55	37

Obwohl die Fehler dieser quantitativen Auswertung mit $\pm 5\%$ in der Größenordnung der beobachteten Salzabhängigkeit liegen, ist diese zweifelsfrei vorhanden. Da für jedes Lipid ein gleichbleibendes immobiles Restspektrum erzielt wurde, gehen die Fehler bei der Festlegung der Subtraktionsendpunkte höchstwahrscheinlich in dieselbe Richtung. Weil diese Fehlerquelle im beschriebenen Versuch die weitaus wichtigste ist, kann man einen gegenläufigen Fehler von 5% in den Spalten 3-6 von Tabelle 4 praktisch ausschließen. Außerdem war auch eine qualitative Beurteilung der Spektren möglich. Es läßt sich also folgern, daß sich das Bindungsgleichgewicht bei zunehmender Ionenstärke zugunsten des in der Detergensmizelle frei beweglichen Lipidanteils verschiebt.

Der Salzeffekt war allerdings nicht völlig reversibel (vgl. 3. und 6. Spalte in Tabelle 4). Vermutlich denaturierte das Protein teilweise während des stundenlangen Aufenthaltes in 1 M oder 0 M NaCl. Die CAT-Bindung des AAC-Proteins erwies sich hingegen in einem Kontrollexperiment mit ^3H -CAT als unempfindlich gegenüber Änderungen der Ionenstärke.

4.5. Abhängigkeit der Phospholipidbindung des AAC vom pH-Wert

Wenn die beobachtete Immobilisierung spinmarkierter Lipide in Anwesenheit des AAC z.T. durch elektrostatische Anziehung hervorgerufen wird, sollte auch der pH-Wert des umgebenden Mediums einen Einfluß auf diesen Effekt haben. Bei hohen pH-Werten werden basische Seitenketten

des Proteins deprotoniert. Die pK_s -Werte der Seitenketten werden für freies Lysin mit 10,79 und für Arginin mit 12,5 angegeben (Edsall & Wyman, 1958). Sie werden durch Peptidbindungen im allgemeinen erniedrigt; so wurde für die ϵ -Aminogruppe der Lysinreste von Proteinen pK_s -Werte von 9,8 - 10,6 gefunden (Edsall & Wyman, 1958).

Andererseits werden bei tiefem pH die Phosphatgruppen der Phospholipide protoniert und damit entladen. Die pK_s -Werte dieser Gruppen wurden früher alkalimetrisch bestimmt (Abramson et al., 1964), während sie heute meist kalorimetrisch (van Dijk et al., 1978) oder auch mit Hilfe von Fluoreszenzsonden (Eibl & Blume, 1979) erhalten werden. Die kalorimetrische Methode beruht auf der Abhängigkeit der Phasenübergangstemperatur der Lipide vom Dissoziationsgrad. Um hinreichend scharfe Phasenübergänge zu erhalten, darf das zu untersuchende Phospholipid nur eine (vorzugsweise gesättigte) Spezies von Fettsäuren enthalten. Da die Totalsynthese von Cardiolipin sehr schwierig ist, sind offenbar für dieses Phospholipid bisher keine pK -Werte veröffentlicht worden. Deshalb wurde für die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche nur 12-PASL eingesetzt. Bei Phosphatidsäure wurden für die erste Dissoziationsstufe Werte von $pK_{s1} = 3,5$ (Eibl & Blume, 1979), 3,8 (Abramson et al., 1964) und 4,0 (van Dijk et al., 1978) veröffentlicht, für pK_{s2} geben dieselben Autoren 9,0, 8,6 bzw. 8,1 - 8,5 an. Da alle diese Bestimmungen an Phospholipid-Doppelschichten durchgeführt wurden, ist eine Korrektur erforderlich. Dafür wurde von Träuble et al. (1976) anhand von Methyl-Phosphatidsäure die Gleichung

$$pK_s(\text{Monomer}) - pK_s(\text{Membran}) = \lg n - 0,86$$

abgeleitet, in der n die Ionenstärke der 1:1 Elektrolyten ist. Sie ist für die erste Dissoziationsstufe der Phosphatidsäure ohne weiteres, für die zweite nur näherungsweise anwendbar, da hier höhere Ladungsdichten auftreten.

Für das in einem etwa 100-fachen Überschuß eines nichtionischen Detergens solubilisierte Lipid dürften eher die Verhältnisse für das Monomer als die in einer Membran zutreffen. In Gegenwart von 0,2 M NaCl lassen sich die pK_s -Werte dann entsprechend umrechnen:

$$pK_s = pK_s(\text{Membran}) - 1,55$$

Für Phosphatidsäure ergeben sich daraus Werte von $pK_{s1} \approx 2$ und $pK_{s2} \approx 7$, die denen der Phosphorsäure ähnlich sind.

Zunächst wurde die Beständigkeit der Bindung des Inhibitors CATSL bei extremen pH-Werten untersucht (Details s. Anhang). Es ergab sich, daß diese Bindung zwischen pH 5 und pH 10 stabil ist, während bei pH 11 bzw. pH 3 keine spezifische Bindung mehr vorhanden war.

Orientierende Versuche ergaben, daß sich der Anteil der proteingebundenen Komponente von 12-PASL zwischen pH 7 und pH 10 nicht ändert, während bei pH 11 der größte Teil mobilisiert wurde. In noch stärker alkalischem Milieu (pH 11,5) wurde Hydrolyse des Lipidmoleküls beobachtet. Die dabei freigesetzte spinmarkierte Fettsäure macht sich im ESR-Spektrum durch ein kleines, aber scharfes Signal im Hochfeldbereich bemerkbar, das dem (geringen) Anteil der Moleküle in der Wasserphase entspricht. Der Äquivalenzpunkt der Argininseitenketten des AAC konnte deshalb mit dieser Methode nicht untersucht werden.

Um den Bereich der Freisetzung des proteingebundenen PASL enger einzugrenzen, wurde eine solubilisierte Proteinprobe mit NaOH titriert und bei fünf Werten > pH 10 jeweils eine Probe entnommen; diese wurden mit gleichen Mengen 12-PASL (Proteinkonzentration 2,9 mg/ml, Lipid/Protein 1,7 mol/mol) inkubiert und ESR-Spektren bei 30°C aufgenommen. Sie zeigten bis pH 10,5 eine stark immobilisierte Lipidkomponente bei nahezu unveränderter Signalform (s. Abb. 9). Ab pH 10,8 wurde jedoch eine deutliche Freisetzung des Lipids beobachtet; bei pH 11 war nur noch ein geringer Anteil gebunden.

Dieser Versuch wurde mit einer höheren Proteinkonzentration (5,1 mg/ml) wiederholt und die erhaltenen Spektren gespeichert, um den jeweils immobilisierten Anteil des 12-PASL mittels Subtraktionen zu bestimmen. Zusätzlich wurde eine Rücktitration auf pH 7,5 vorgenommen, um zu prüfen, ob der Effekt reversibel ist. Dies war nur teilweise der Fall, denn statt vorher 79% waren jetzt noch 33% des Phospholipids gebunden, nachdem bei pH 11 alles Lipid bis auf 12% freigesetzt worden war. Dieser große Unterschied von 46% abs. kann nicht allein auf die gestiegenen Salzkonzentration zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 4.4). Es muß daher angenommen werden, daß infolge einer denaturierenden Entfaltung des AAC-Proteins bei hohem pH ein Teil der Bindungsstellen für Phosphatidsäure nicht mehr zugänglich war.

Abb. 10 zeigt die pH-Abhängigkeit der Bindung von 12-PASL an den AAC in Form einer Titrationskurve. Die in der Abbildung gegen den pH-Wert aufgetragenen Bindungsdaten wurden dadurch gewonnen, daß sowohl die mobile als auch die immobile Komponente von jedem Spektrum subtrahiert wurde und jeweils der Mittelwert beider Bestimmungen des gebundenen Anteils verwendet wurde. Man erkennt einen "Äquivalenzpunkt" bei $\text{pH} \approx 10,8$, der recht gut mit dem pK_s -Wert für die ϵ -Aminogruppe von freiem Lysin übereinstimmt (Edsall & Wyman, 1958).

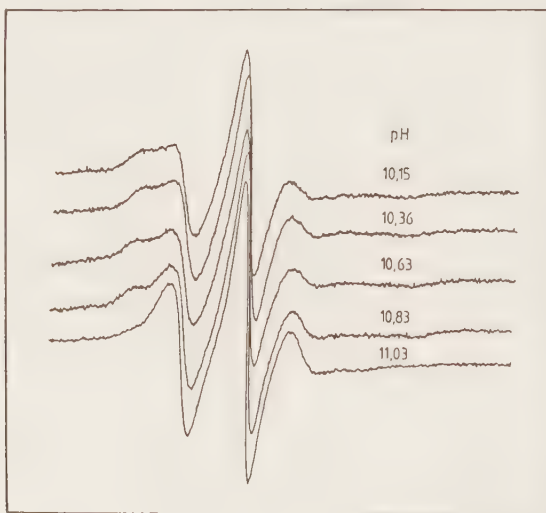


Abb. 9

Freisetzung von proteingebundenem 12-PASL bei hohem pH-Wert.

Eine solubilisierete Proteinprobe (2,9 mg/ml, 1,5 Gew.-% Triton X-100) wurde mit NaOH auf die angegebenen pH-Werte gebracht und jeweils 50 μl entnommen. Diese wurden mit gleichen Mengen spinmarkierter Phosphatidsäure (1,7 mol/mol AAC) inkubiert und ESR-Spektren bei 30°C aufgenommen.

Das Verhältnis von immobilisiertem zu mobilem Lipid ändert sich erst bei $\text{pH} > 10,5$.

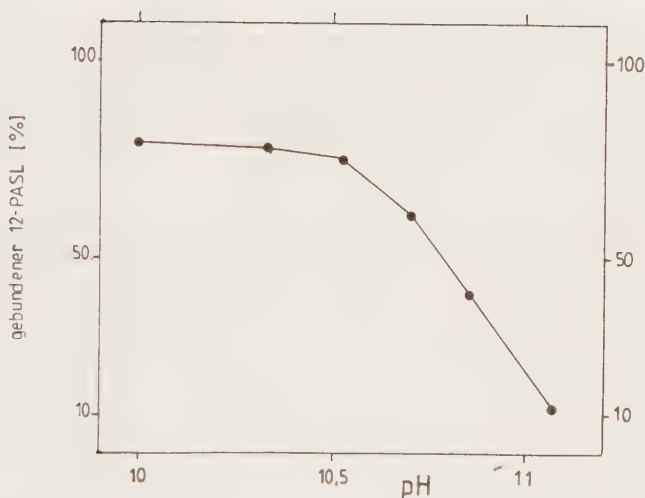


Abb. 10

Abhängigkeit der immobilisierten Lipidkomponente von pH-Wert.

Analoger Versuchsablauf wie in Abb. 9 mit den folgenden Daten : Proteinkonzentration 5,1 mg/ml, 2,4 Gew.-% Triton, 0,9 mol 12-PASL/mol AAC = 67 μ M PASL $\equiv$ 100%. Der jeweils proteingebundene Anteil wurde durch digitale Subtraktion beider spektraler Komponenten und anschließende Mittelwertbildung bestimmt (s. Methoden).

Der "Äquivalenzpunkt" liegt etwa bei pH = 10,8.

Ein analoger Versuch wurde auch im sauren Bereich durchgeführt. Eine Proteinprobe (5,3 mg/ml, 547 mol Triton X-100/mol Protein) wurde mit HCl titriert, Aliquots bei $7,2 < \text{pH} < 2$ entnommen und mit äquimolaren Mengen an 12-PASL inkubiert. Wiederum wurden die ESR-Spektren der Proben bei 30°C aufgenommen. Dieser Versuch führte nicht zu einem vollen Erfolg, da sich der Umschlagbereich anhand der Spektren nicht eingrenzen ließ. Es war zwar eine erhebliche Abnahme der gebundenen Komponente zu beobachten; am Ende der Titration entsprach das Spektrum etwa dem von 12-PGSL bei neutralem pH (vgl. Abb. 6). Diese Freisetzung von gebundenem PASL schien jedoch kontinuierlich vonstatten zu gehen, so daß kein Äquivalenzpunkt gefunden werden konnte. Änderungen um 0,5 pH-Einheiten führten jeweils nur zu geringen spektralen Effekten. Auch die Subtraktionen lieferten hier kein befriedigendes Ergebnis, vermutlich weil die Linienform der mobilen spektralen Komponente vom Dissoziationsgrad und damit vom pH des Mediums abhängt. Der erwartete Einfluß

einer sauren Umgebung konnte daher nur qualitativ bestätigt werden.

Zumindest im alkalischen Bereich fallen also die "Äquivalenzpunkte" von Inhibitor- und Phospholipidbindung des AAC ungefähr zusammen (vgl. Anhang, 7.1.). Auch die Bindung der spezifischen Inhibitoren dürfte einen teilweise (oder vorwiegend) elektrostatischen Charakter haben.

4.6. Auswertung der Proteinbindung spinmarkierter Lipide nach Scatchard

Um quantitative Aussagen über die Zahl der Bindungsstellen und die Festigkeit der Bindung zu gewinnen, wurden für die Lipide mit den höchsten relativen Bindungskonstanten (vgl. Tab. 2), nämlich CLSL, PASL und SASL, Bindungsdaten bei unterschiedlichen Lipid/Protein-Verhältnissen nach Scatchard (1949) ausgewertet. Bei der hier gewählten Version der Darstellung wird das Verhältnis der Konzentrationen von gebundenem Ligand und Protein gegen das Verhältnis von gebundenem und freiem Ligand aufgetragen. Für n gleiche, voneinander unabhängige Bindungsplätze gilt die Gleichung

$$\frac{c_{\text{gebunden}}}{c_{\text{Protein}}} = n - \frac{c_{\text{gebunden}}}{c_{\text{frei}}} \cdot \frac{K_{\text{Diss}}}{c_{\text{Protein}}}$$

Die Zahl der Bindungsstellen (n) ergibt sich bei dieser Art der Auftragung als Ordinatenabschnitt, während die Steigung der Geraden noch mit der Proteinkonzentration zu multiplizieren ist, um die Dissoziationskonstante zu erhalten.

Aliquots einer Proteinprobe wurden mit unterschiedlichen Mengen an 12-CLSL inkubiert, so daß ein Bereich von 0,5 - 5 mol Lipid/mol Protein abgedeckt wurde. Um der Aggregation des Proteins (s. Abschnitt 4.10.) zuvorzukommen, wurden sofort nach der Auflösung der Filme ESR-Spektren bei 20°C aufgenommen, nötigenfalls akkumuliert und gespeichert. Anschließend wurde die Spinkonzentration in jeder Probe durch doppelte Integration bestimmt. Die weitere Auswertung erfolgte, wie im Methoden-teil angegeben, sowohl durch Subtraktionen von Kontrollspektren als auch mit der Intersubtraktionsmethode. Die für die beiden so erhaltenen Serien von Datenpunkten getrennt berechneten Ausgleichsgeraden stimmten recht gut überein (s. Abb. 11). Aus diesen beiden Auswertungen ergeben sich 2,09 bzw. 1,96 Bindungsstellen pro Proteindimer und Dissoziationskonstanten von 29,6 μM bzw. 26,2 μM .

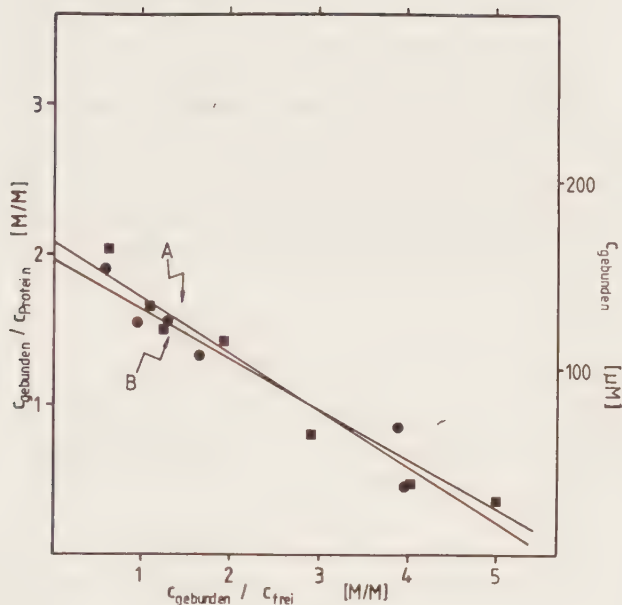


Abb.11

Auswertung der Bindungsdaten von 12-CLSL nach Scatchard.

Aliquots einer Proteinprobe (5,3 mg/ml, 1,6 Gew.-% Triton X-100) wurden mit unterschiedlichen (0,5 - 5 mol/mol AAC) Mengen 12-CLSL inkubiert. Das Lipid wurde in Form trockener Filme vorgelegt und durch Schütteln mit den Proteinproben solubilisiert (s.Methoden), um die Detergenskonzentration nicht zu verändern (s. Text). Die ESR-Spektren wurden bei 20°C akkumuliert. Die Gewinnung der spektralen Komponenten erfolgte durch Subtraktion eines "mobilen" Spektrums (Ausgleichsgerade A, Symbol Quadrat) bzw. des Zweikomponentenspektrums mit CLSL/AAC = 0,5 (Ausgleichsgerade B, Symbol Kreis). Der weitere Auswertungsmodus wird im Text erläutert.

Diese Konstanten beziehen sich wie sämtliche eingesetzten Konzentrationsangaben auf das gesamte Probenvolumen. Sowohl das solubilisierte Membranprotein als auch die Phospholipidmoleküle halten sich jedoch ausschließlich in den Detergensemizellen auf. Daraus ergibt sich, daß die Detergenskonzentration während einer solchen Meßreihe konstant gehalten werden muß, was durch den o.a. Versuchsablauf gewährleistet ist.

Weiterhin folgt aus dieser Betrachtung, daß die Zahlenwerte für K_{Diss} nur für die Versuchsbedingungen gelten, unter denen sie bestimmt wurden; es handelt sich also um scheinbare oder "effektive" Dissoziationskonstanten. Wahre K_{Diss} -Werte müßten auf das Volumen der Gesamtheit der Detergens-Mizellen bezogen werden (s. Diskussion). Außer der Detergenskonzentration beeinflusst auch die Ionenstärke der wässrigen Phase die Bindungskonstante (s. Abschnitt 4.4). Die Zahl der Bindungsstellen wird von dieser Einschränkung nicht berührt.

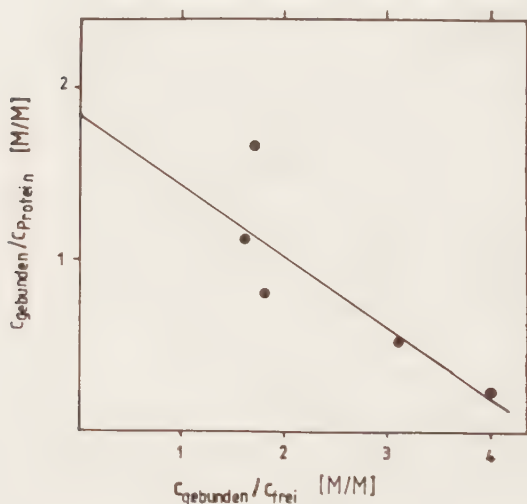


Abb. 12

Auswertung der Bindungscharakteristik von 12-PASL nach Scatchard.

Der Versuch lief analog wie in Abb. 11 ab. Die analytischen Daten waren 3,8 mg AAC-Protein/ml, 0,8 Gew.-% Triton, 0,3 - 3 mol PASL/mol Protein. Die Auswertung erfolgte hier nur durch Subtraktion des Spektrums einer proteinfreien Vergleichsprobe des spinmarkierten Lipids. Durch die fünf Meßpunkte wurde versuchsweise eine Ausgleichsgerade gelegt (vgl. Text).

Ein analoges Experiment wurde auch mit spinmarkierter Phosphatidsäure (12-PASL) angestellt, allerdings mit etwas abweichenden Konzentrationsverhältnissen (s. Legende zu Abb. 12).

Subtraktion eines Spektrums von 12-PASL in Triton X-100 und Auftragung der Daten nach Scatchard ergab nach linearer Regression $n = 1,9$ Bindungsstellen und eine scheinbare K_{Diss} von $25 \mu M$. In diesem Fall ließe sich aber auch eine nach oben konkave Kurve durch die Datenpunkte legen; dies könnte bedeuten, daß außer wenigen Bindungsplätzen mit hoher Affinität eine größere Zahl weiterer Bindungsstellen mit hoher K_{Diss} vorhanden ist (s. Diskussion). Eine alternative Interpretationsmöglichkeit bildet die Annahme einer kooperativen Wechselwirkung zwischen dem Lipid und dem Protein. Für das vorliegende System erscheint sie aber recht unwahrscheinlich (vgl. Cantor & Schimmel, 1980, S. 861 sowie Diskussion).

Schließlich wurde noch ein entsprechender Versuch mit spinmarkierter Fettsäure (12-SASL) durchgeführt. Wieder wurden Aliquots einer Proteinprobe (6 mg/ml, 340 mol Triton X-100/mol Protein) mit unterschiedlichen Mengen der Spinsonde (0,4 - 4 mol SASL/mol Protein) inkubiert und ESR-Spektren bei $20^\circ C$ aufgenommen, akkumuliert und gespeichert. Um Integrationsfehler möglichst zu unterdrücken, wurde zu jeder Probe eine Vergleichsprobe mit etwa gleicher Spinkonzentration vermessen und deren Spektrum jeweils zur Subtraktion verwendet (s. Methoden). Dieses Experiment lieferte jedoch keine nach Scatchard auswertbaren Daten, weil das Verhältnis von gebundener und freier Fettsäure im Rahmen der Auswertungsgenauigkeit konstant blieb (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Bindung von spinmarkierter Stearinsäure an den AAC bei unterschiedlichem Lipid/Protein-Verhältnis

$c_{SASL} [\mu M]$	$c_{gebunden} [\mu M]$	$\frac{c_{gebunden}}{c_{Protein}}$	$\frac{c_{gebunden}}{c_{frei}}$
37	12,3	0,14	0,49
58	19,2	0,21	0,50
86	32,0	0,36	0,59
161	56,7	0,63	0,54
309	100,9	1,12	0,49

Die Intersubtraktionen dieser fünf Spektren führten jeweils nur zu Basislinien, d.h. die Linienform aller Spektren war praktisch identisch. Daher konnten weder für n noch für K_{Diss} Zahlenwerte bestimmt werden. Vermutlich verläuft die wirkliche Gerade so steil, daß ihre Steigung im zugänglichen Konzentrationsbereich wegen der experimentellen Fehler (s.u.) nicht bestimmbar war. Dies würde eine große Zahl von Bindungsstellen mit hoher Dissoziationskonstante, also geringer Affinität bedeuten, wie es für PASL bereits angedeutet wurde (s. Diskussion).

4.6.1. Fehlerbetrachtung für diese Auswertung

Die im Abschnitt 4.6. angegebenen Bindungsparameter sind mit verschiedenen Fehlern belastet, die sich aus der Datenaufarbeitung ergeben. Zunächst sind besonders bei verrauschten Spektren mit driftender Basislinie, also von Proben mit geringer Spinkonzentration, Integrationsfehler unvermeidlich. Ein Vergleich der pipettierten mit der durch Doppelintegration bestimmten Menge an Spinsonde gab immerhin Hinweise, welche Spektren evtl. von der Auswertung auszuschließen waren. Weiterhin ist die Festlegung des Subtraktionsendpunktes (s. Methoden) etwas beliebig, da keine der Meßreihen ein immobiles Einkomponentenspektrum enthielt. Im Vergleich zu den analogen Experimenten mit rekonstituierten Membranen mit am 14. C-Atom einer Fettsäurekette markierten Lipiden (vgl. Marsh, 1985) ist der dadurch eingeführte Fehler hier größer. Die Auflösung der beiden spektralen Komponenten ist hier (bei Markierung am 12. C-Atom und in Triton X-100) nämlich schlechter, da die Halbwertsbreite der beiden überlagerten Signale im Tieffeldbereich mit 6-7 Gauss etwa gleich ihrem Abstand ist. Durch getrennte Subtraktion beider spektraler Komponenten wurde versucht, die Ergebnisse abzusichern. Der Einfluß von "chemischem Austausch" von freiem und gebundenem Lipid auf die Linienform konnte dagegen nicht berücksichtigt werden; um ihn zu verlangsamen und damit seinen Effekt auf die Spektren zu vermindern, wurde eine Temperatur von 20°C gewählt, obwohl bei 30°C die Spektren qualitativ besser zu beurteilen sind.¹

¹ Ab etwa 60°C waren infolge schnellen Austausches nur noch Einkomponentenspektren zu beobachten. Daß dieser Effekt nicht durch Proteindenaturierung zustande kam, zeigt das Wiedererscheinen der immobilisierten Komponente nach Abkühlen der Probe.

Auch die bei höheren Lipid/Protein-Verhältnissen eintretende Proteinaggregation (s. Abschnitt 4.10.) könnte die Auswertung beeinträchtigen, wenn sich der aggregierte Protein-Lipid-Komplex nicht im Bindungsgleichgewicht befindet. Dies scheint indes der Fall zu sein, da eine Verdrängung von spinmarkierten durch unmarkiertes Cardiolipin (s. Abschnitt 4.3) auch in durch Aggregate getrübbten Proben noch möglich ist. Daher dürfte Proteinaggregation als Fehlerquelle hier keine Rolle spielen. Selbstverständlich gingen auch die Fehler der Proteinbestimmung nach Lowry (1951) in den erhaltenen Wert für n ein.

Alles in allem ergibt sich, daß die Genauigkeit der hier vorgestellten Daten nicht mit den z.B. mittels Gleichgewichtsdialyse erhaltenen Werten zur Coenzym- oder Inhibitorbindung von Enzymen konkurrieren kann. Protein-Phospholipid-Wechselwirkungen können allerdings mit der letztgenannten Methode nicht untersucht werden.

4.7. Versuche zur Zugänglichkeit der proteingebundenen Phospholipide

Wie bereits ausführlich dargestellt wurde, erfahren spinmarkierte Fettsäure- und Phospholipidmoleküle in Anwesenheit des Detergens-solubilisierten AAC-Proteins eine Immobilisierung. Man könnte nun vermuten, diese käme durch sterische Einengung der Lipide in Spalten der Proteinoberfläche oder auch zwischen den Monomeren des Proteins zustande. Um zu überprüfen, ob das immobilisierte Lipid durch das Protein abgeschirmt wird, wurden Experimente zur Zugänglichkeit der proteingebundenen Lipide unternommen. Dazu wurde zunächst das Ascorbat-Ion ($MG = 175$), dann das wasserlösliche Enzym Phospholipase A_2 ($MG \approx 14000$) eingesetzt.

In beiden Fällen wurde die Reaktionskinetik ESR-spektroskopisch im Minuten- bis Stundenbereich verfolgt. Findet ein um Größenordnungen schnellerer Austausch des gebundenen gegen das freie Lipid statt, so kann u.U. auch dann keine Verlangsamung der Reaktionen erwartet werden, wenn eine (dann kurzfristige) Abschirmung vorhanden sein sollte. Die Aussagekraft der in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche beschränkt sich daher auf den Nachweis einer dauernden Abschirmung.

4.7.1. Reduktion der Nitroxylgruppe mit Ascorbat

Nitroxylverbindungen werden durch Ascorbat vollständig reduziert, wobei der Paramagnetismus verlorengeht. (Wahrscheinlich entstehen die entsprechenden Hydroxylamin-Verbindungen.) Besonders glatt verläuft die Reaktion mit der 4,4-Dimethyl-oxazolidinyloxyl ("Doxyl")-Gruppe (Lee et al., 1979), die in dieser Arbeit zur Spinmarkierung der Lipide eingesetzt wurde. ESR-spektroskopisch beobachtet man das Verschwinden der Nitroxylsignale; intermediär erscheint im Zentrum des Spektrums das Signal des Ascorbyl-Radikals, das später ebenfalls verschwindet. Wird das Reduktionsmittel in großem Überschuß eingesetzt, so läßt sich die beobachtete Reaktionskinetik nach der ersten Ordnung auswerten (Onishi & Morales, 1976), wobei dann die Halbwertszeit von der Nitroxylkonzentration unabhängig ist.

Für die Reduktion von am 12. C-Atom einer Fettsäurekette spinmarkierten Phospholipiden in Triton-Mizellen stellte sich eine recht hohe (100 mM) Ascorbatkonzentration als günstig heraus, da die Nitroxylgruppe im Innern der Mizelle teilweise geschützt ist. Da Fettsäuren eine erheblich größere Wasserlöslichkeit besitzen als Phospholipide, werden ihre spinmarkierten Derivate unter den verwendeten Bedingungen etwa dreimal schneller reduziert als die der Glycerophospholipide. In detergensfreiem Puffer waren die ESR-Signale von 12-SASL nach Zugabe von Ascorbat sogar augenblicklich verschwunden.

Man kann nun entweder in möglichst kurzen Zeitabständen komplette ESR-Spektren aufnehmen oder aber einen Punkt des Spektrums kontinuierlich beobachten. Im ersten Fall hat man die Möglichkeit, die einzelnen Signale getrennt auszuwerten, im zweiten Fall gewinnt man unmittelbar Meßkurven, die die Zeitabhängigkeit der Signalamplitude direkt wiedergeben. Nach einigen Vorversuchen wurde die kontinuierliche Messung am Ort maximaler Signalamplitude des Nitroxylspektrums bevorzugt. Für ein akzeptables Verhältnis von Signal zu Rauschen ist nämlich eine Zeitkonstante von 0,5 s nötig, was bei Aufnahme ganzer Spektren zu einer Meßzeit von 500 s führt; innerhalb der Dauer des Experiments von 30 Minuten ließen sich so nur vier Spektren aufnehmen. Eine mögliche Sättigung der Spin-Übergänge stellt unter den angewendeten Meßbedingungen (Leistung $P = 5 \text{ mW}$) kein Problem dar (vgl. Hartsel et al., 1987).

Eine Probe von CAT-AAC-Protein wurde mit soviel 12-PASL inkubiert, daß etwa die Hälfte davon im ESR-Spektrum immobilisiert erschien. Als Referenzprobe wurde eine gleiche Menge PASL im gleichen Detergens, aber ohne Protein solubilisiert. Dann wurde jeweils die dem Maximum der Signalamplitude entsprechende Magnetfeldstärke bestimmt und fest eingestellt. Nach Zugabe von 100 mM Natriumaskorbat (Endkonzentration), was etwa einem 1000-fachen Überschuß über die Spinprobe entsprach, wurde die Reaktion kontinuierlich bei 30°C über 30 Minuten verfolgt. Die aufgezeichneten Kurven (s. Abb.13) verlaufen bis etwa 20 Minuten nach dem Start monoexponentiell (Korrelationskoeffizienten 0,9976 und 0,9963 für die proteinhaltige bzw. die proteinfreie Probe), wobei jeweils 13 Punkte ausgewertet wurden. Die Halbwertszeiten für die Spinreduktion waren mit 5,3 min bzw. 4,7 min im Rahmen der Meßgenauigkeit in beiden Ansätzen gleich. Wiederholte Versuche mit proteinfreien Kontrollproben ergaben eine ebenso große Streuung.

Fehler konnten hier beim Pipettieren der Askorbatlösung (10 μ l) oder durch deren Alterung infolge des Zutritts von Luftsauerstoff auftreten (Weissberger et al., 1943). Möglich wäre auch ein systematischer Fehler durch Überlappung der ESR-Signale des Nitroxyls und des intermediär auftretenden Askorbyls, das anschließend mit Sauerstoff weiterreagiert.

Da letzteres Signal aber sehr schmal ist und die beiden g-Faktoren etwas differieren, ist die Überlagerung zunächst vernachlässigbar. Da das Askorbyl-Radikal langsamer abgebaut wird als das Nitroxyl, hätte sich andernfalls eine zweiphasige Kinetik ergeben müssen. Tatsächlich beginnen die Meßkurven nach etwa 20 Minuten abzuflachen, weil dann das Askorbyl offenbar einen größeren Beitrag zur Signalthöhe leistete.

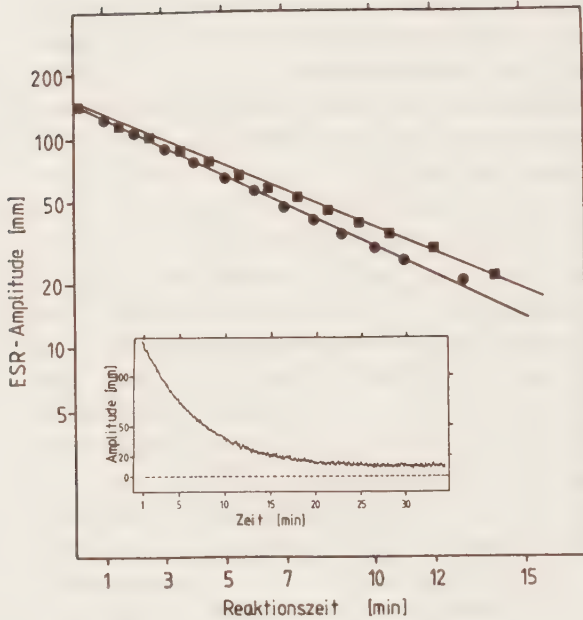


Abb. 13

Reduktionskinetik von spinmarkierten Phosphatidsäure in An- und Abwesenheit des AAC-Proteins.

Eine solubilisierete Probe des AAC-Proteins (3,6 mg/ml) wurde mit 12-PASL inkubiert (PASL/AAC = 2,5 mol/mol; Quadrate). Eine gleich konzentrierte (138 μ M) Lösung von 12-PASL wurde in 1 Gew.-% Triton X-100 in Abwesenheit des Proteins hergestellt (Kreise). Beide Proben wurden mit 100 mM Natrium-askorbat (Endkonzentration) versetzt und die Abnahme der ESR-Amplitude des $m=0$ -Spinüberganges kontinuierlich verfolgt (Einschub). Aus den so erhaltenen Meßkurven wurden je 13 Punkte herausgegriffen und halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Für beide Proben ergab sich eine gute Korrelation, der Unterschied von 12% in den Geschwindigkeitskonstanten pseudoerster Ordnung ist nicht signifikant (s.Text).

Diese Versuche zeigen, daß die Einbettung der Nitroxylgruppe in eine Detergensmizelle einen partiellen Schutz vor Reduktion durch das hydrophile Askorbat-Ion bewirkt. Eine zusätzliche Abschirmung proteingebundener Lipide durch den AAC war dagegen innerhalb der Genauigkeit dieses Experiments ($\pm 10\%$) nicht nachweisbar.

4.7.2. Enzymatische Abspaltung der spinmarkierten Fettsäure

Wegen der geringen Größe des Ascorbat-Ions können allein nach den in Abschnitt 4.7.1. beschriebenen Reduktionsversuchen Protein-Protein-Wechselwirkungen als Ursache der Immobilisierung spinmarkierter Lipide nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden ergänzende Versuche zum enzymatischen Abbau der proteingebundenen Lipidmoleküle durchgeführt. Wenn diese auch für ein Enzym zugänglich sind, kann man daraus schließen, daß räumliche Einengung als Grund der beobachteten Immobilisierung ausscheidet. (Phospholipidmoleküle sind wesentlich kleiner als Enzyme, die ja Proteine sind.)

Wasserlösliche Phospholipasen vom Typ A_2 sind - u.a. wegen ihrer 6-7 Disulfidbrücken - sehr stabile Proteine, die selbst bei 100°C nur langsam denaturieren (Deems & Dennis, 1981). Daher war auch während mehrstündiger Inkubationen keine Inaktivierung zu befürchten. Diese Enzyme, die meist aus Schlangengiften oder dem Pankreassaft von Säugern isoliert werden, greifen nicht nur Membranen, sondern auch Detergens-solubilisierter Phospholipide an (Dennis, 1973). Ihre Funktion besteht in der Hydrolyse der sn_2 -Esterbindung von Phospholipiden; dafür benötigen sie Ca^{++} -Ionen. Bei den spinmarkierten Analoga der Phospholipide führt dies zur Freisetzung der spinmarkierten Fettsäure (vgl. Synthesen im Methodenteil). Im ESR-Spektrum machen sich zwei unterschiedliche Effekte bemerkbar: Einerseits ergibt sich aufgrund der größeren Beweglichkeit der abgespaltenen Fettsäure eine Abnahme der Linienbreite, die mit einer Zunahme der Amplitude einhergeht; zusätzlich tritt bei Zweikomponentenspektren (also in Anwesenheit eines Proteins) eine Verschiebung des Verhältnisses dieser Komponenten auf, da die relativen Bindungskonstanten von Phospholipid und Fettsäure voneinander abweichen. Solubilisiertes CAT-AAC-Protein wurde mit einem fünffachen molaren Überschuß an 12-CLSL inkubiert, so daß sich ein Zweikomponentenspektrum ergab. Anschließend wurde der Phospholipid-Protein-Komplex in Anwesenheit von 5 mM Ca^{++} mit Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas behandelt. Die Lipidkonzentration entsprach dabei ungefähr einem 600-fachen molaren Überschuß über das Enzym. Innerhalb von 2,5 h wurden insgesamt zehn ESR-Spektren des Reaktionsansatzes

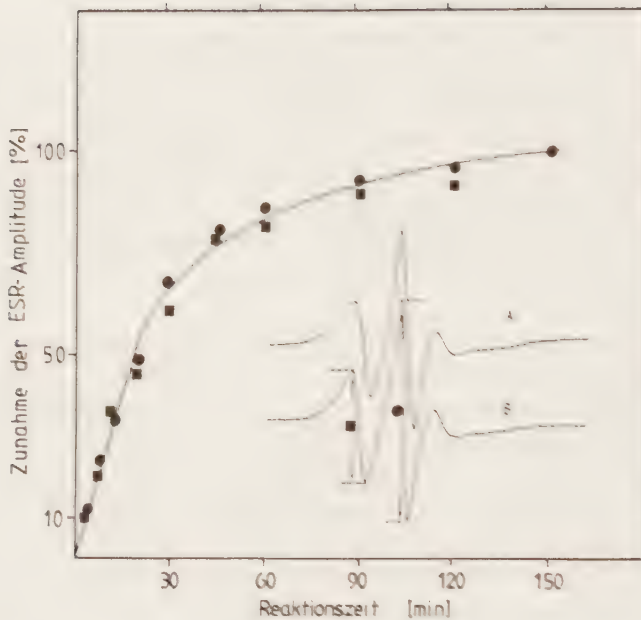


Abb. 14

Abbau von spinmarkiertem Cardiolipin durch Phospholipase A_2 in Anwesenheit des AAC-Proteins

Analytische Daten der verwendeten Probe waren eine Proteinkonzentration von 5.3 mg/ml, ein Detergensgehalt von 1.5 Gew.-% sowie ein CLSL Protein-Verhältnis von 5 mol/mol. Nach Zugabe von 5 mM Ca^{++} (Endkonzentration) wurde mit Phospholipase A_2 aus Schweinepankreas inkubiert.

ESR-Spektren bei 30°C wurden anfangs in möglichst kurzen Zeitabständen aufgenommen. Der Einschub zeigt die Spektren vor Enzymzugabe (A) bzw. nach Ablauf der Reaktion (B). Die in Spektrum B markierten Amplituden wurden in jedem Spektrum ausgemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Die gesamte Amplitudenzunahme betrug 11% bzw. 18% der Ausgangsamplitude (jeweils entsprechend 100% auf der Ordinate).

aufgenommen und die Amplituden an zwei in jedem Spektrum eindeutig lokalisierbaren Punkten ausgewertet (s. Abb. 14). Zur gemessenen Amplitude im Tieffeldbereich tragen hauptsächlich die ungebundenen Anteile von 12-CLSL und 12-SASL bei, während das Signal im Zentrum des Spektrums eine Überlagerung aller vier Komponenten (proteingebundener und

freier CLSL und SASL) darstellt. Wegen der erwähnten Linienverschmälerung nahm auch dessen Amplitude im Verlauf des Experiments zu. Die gesamte relative Amplitudenzunahme betrug für das Tieffeldsignal 23% gegenüber 18% für das zentrale Signal.

Für die ersten 30 Minuten ergab sich ein linearer Anstieg beider Amplituden mit der Zeit, dann nahm die Reaktionsgeschwindigkeit rasch ab; der letzte Meßpunkt wurde als Endwert nach vollständigem Umsatz betrachtet. Versuchsweise wurde dann der jeweilige prozentuale Umsatzgrad nach

$$U = \frac{A_t - A_0}{A_\infty - A_0} \cdot 100$$

berechnet. A_0 ist dabei die Amplitude zu Beginn, A_∞ die nach Beendigung der Umsetzung, A_t entspricht der Signalamplitude zur Zeit t . Die beiden ausgewerteten Amplituden (s. Abb. 14) zeigten eine nahezu identische Zeitabhängigkeit. Dabei ist zu beachten, daß das Signal im Zentrum des Spektrums lediglich verschmalert wird, während das Tieffeldsignal der freien Lipidkomponente zusätzlich wegen der kleineren relativen Bindungskonstante von SASL gegenüber CLSL zunimmt. Offenbar verlief der enzymatische Abbau für alle beteiligten spinmarkierten Phospholipidmoleküle mit einheitlicher Geschwindigkeit. Die einfachste Interpretation dieses Ergebnisses besteht in der Annahme, daß die Reaktionsgeschwindigkeit aufgrund von Substratsättigung des Enzyms zunächst konstant ist (Reaktion "nullter" Ordnung); mit Erschöpfung des Substrates ginge die Reaktionsrate dann gegen Null.

Die meßbaren Effekte waren in diesem und anderen, analogen Versuchen allerdings recht klein: Nach Beendigung der Reaktion waren die Amplituden bei der gewählten Einstellung des Geräteschreibers um 20 - 30 mm höher als zu Beginn. Daher bewährte sich die kontinuierliche Aufzeichnung hier nicht, weil dabei nur die Höhe über der Basislinie registriert wird, was zu einem weiteren Verlust an Empfindlichkeit etwa um die Hälfte führt.

Noch geringer (ca. 10 mm nach Vollumsatz) war die Amplitudenzunahme in proteinfreien Kontrollproben, wo sie ausschließlich durch Linienverschmälerung zustande kommen konnte (s.o.). Deswegen war die Streuung der Meßwerte zu groß, um die Kinetik der Reaktion ESR-spektroskopisch

auszuwerten. Daß Phospholipase A₂ in Triton-Mizellen aktiv ist und auch spinmarkierte Phospholipide als Substrate dienen können, läßt sich aber der Literatur entnehmen (Dennis, 1973; Cable et al., 1978).

Die Frage nach einer möglichen Abschirmung der gebundenen Phospholipide durch das Protein kann anhand dieser Versuche dennoch beantwortet werden. Würde nämlich das proteingebundene Phospholipid nicht angegriffen werden, wäre im resultierenden Zweikomponentenspektrum eine geringere relative Amplitudenänderung zu erwarten als in Einkomponentenspektren des frei in Detergensemizellen beweglichen Lipids. Tatsächlich wurde das Gegenteil beobachtet: Die relative Amplitudenzunahme des zentralen Signals betrug im Zweikomponentenspektrum 18%, bei einem vergleichbaren Einkomponentenspektrum nur 7%, jeweils bezogen auf die Ausgangsamplitude. Daraus ergibt sich eindeutig, daß auch proteingebundene Cardiolipinmoleküle durch Phospholipase A₂ gespalten werden. Ob dieser Angriff verlangsamt erfolgt, läßt sich allerdings nicht sagen. Dagegen spricht aber der übereinstimmende zeitliche Verlauf der Amplitudenzunahme beider Signale. Die in Abb. 14 gegen die Zeit aufgetragenen Prozentwerte beziehen sich auf die gesamte Amplitudenänderung, die jeweils gleich 100% gesetzt wurde.

Von einer Reihe ergänzender Versuche sollen nur die Ergebnisse kurz dargestellt werden. Bei 20°C verlief der enzymatische Abbau etwa halb so schnell wie bei 30°C. Die Geschwindigkeit der prozentualen Amplitudenzunahme nahm mit der Enzymkonzentration ab. Das entspricht ebenfalls dem für eine enzymatische Reaktion bei Substratsättigung erwarteten Verhalten. Auch in präzipitierten Protein-Phospholipid-Aggregaten (s. Abschnitt 4.10.) fand die Spaltung statt. Alle übrigen, am 12. C-Atom einer Fettsäurekette spinmarkierten Phospholipide (12-PASL, 12-PGSL, 12-PESL und 12-PCSL) wurden in gleicher Weise angegriffen.

4.8. Abhängigkeit der Phospholipidbindung vom Detergens

4.8.1. Triton X-100

Es wurde bereits erwähnt, daß der Detergensgehalt der Proteinproben vor Inkubation mit den spinmarkierten Lipiden herabgesetzt wurde, um einen höheren Anteil an immobilisierter Spinsonde zu erhalten. Bei höherem Detergensgehalt wird die Zahl der proteinfreien Detergensemizellen vermehrt. Wenn eine Verteilung der Lipide auf proteinhaltige und proteinfreie Mizellen erfolgt, muß dies zur Abnahme des proteingebundenen Anteils führen, und die scheinbare Dissoziationskonstante des Protein-Phospholipid-Komplexes steigt an.

Statt einer Auswertung in Form von Scatchard-Auftragungen (vgl. Abschnitt 4.6.) wurde im folgenden der Einfluß der Detergensenkonzentration auf die Menge des proteingebundenen Lipids bei konstantem Verhältnis von Phospholipid zu Protein untersucht. Aus den sechs in diese Arbeit einbezogenen spinmarkierten Lipiden wurde das mit der höchstem und das mit der niedrigsten relativen Bindungskonstante herangezogen, also Cardiolipin und Phosphatidylcholin.

Eine solubilisierete Proteinprobe (4 mg/ml, 1,6 Gew.-% Triton X-100) wurde in sechs Aliquots aufgeteilt. In zweien dieser Proben wurde der Detergensgehalt vermindert (s. Methoden), in drei anderen erhöht; eine Kontrollprobe blieb unbehandelt. Nach Inkubation mit jeweils 1,8 mol 12-CLSL/mol AAC wurden ESR-Spektren bei 30°C aufgenommen und durch Subtraktion der mobilen Komponente ausgewertet (s. Methoden). Außerdem wurde die Triton-Konzentration in jeder Probe bestimmt. Wie erwartet zeigt sich eine Abnahme des immobilisierten Anteils der Spinsonde mit ansteigender Detergensenkonzentration (s. Tabelle 6).

Das proteingebundene Cardiolipin verteilt sich also tatsächlich auf die gesamte Detergensenmenge, denn andernfalls könnte eine nachträgliche Zugabe von Detergens keinen Einfluß auf den immobilisierten Lipidanteil haben. Weiterhin ergibt sich aus den Daten, daß die im ESR-Spektrum beobachtbare Immobilisierung wahrscheinlich nicht einfach alle Moleküle betrifft, die sich in den proteinhaltigen Mizellen aufhalten; auch wenn

Tabelle 6. Abhängigkeit der Cardiolipinbindung des AAC-Proteins von der Detergengkonzentration

Gew.-% Triton	TX/Protein [mol/mol]	% Triton, "gebunden" ¹	"Freies" TX/CLSL ¹ [mol/mol]	% CLSL, immobil
0,5	134	≈ 100	0	85
0,8	214	77	27	73
1,6 ²	427	39	146	62
5,0	1335	12	650	41
8,0	2137	8	1096	33
21,5	5743	3	3100	29

¹ Für die Berechnung dieser Werte wurde eine "Tritonbindung" des AAC von 165 mol/mol eingesetzt (vgl. Hackenberg & Klingenberg, 1980)

² Ursprüngliche Konzentration

die Triton-Konzentration gerade zur Solubilisierung des Proteins ausreicht (Hackenberg & Klingenberg, 1980), bleibt eine erkennbare mobile Komponente. Das heißt, daß die ESR-spektroskopisch beobachtbare Immobilisierung der spinmarkierten Lipidmoleküle tatsächlich ihre Bindung an die Proteinoberfläche reflektiert.

Vergleicht man die Verdrängung von proteingebundenen Lipidmolekülen durch Triton X-100 mit der durch Phospholipide hervorgerufenen, so erweisen sich letztere als weit wirksamer. (Der effektive Detergensüberschuß kann der vorletzten Spalte von Tabelle 6 entnommen werden.) Wie qualitative Vergleiche der entsprechenden Spektren ergeben, hat ein dreitausendfacher Überschuß von Triton X-100 einen geringeren Effekt als ein zwanzigfacher Überschuß an Cardiolipin. Ein zwanzigfacher Überschuß an PE hat immer noch etwa die gleiche Wirkung wie ein tausendfacher Detergensüberschuß. Auch bei sehr hohen Detergengkonzentrationen wurde noch eine immobilisierte Lipidkomponente beobachtet. Also ist die Affinität selbst der neutralen Phospholipide zum AAC-Protein höher als die des Detergens Triton X-100, weshalb die Bevorzugung von Phospholipiden nicht allein auf elektrostatische Wechselwirkungen zurückführbar ist.

Auch spinmarkiertes Phosphatidylcholin wurde in ähnlicher Weise untersucht, allerdings nur bei abnehmender Detergensenkonzentration. In Aliquots einer Proteinprobe (3,5 mg/ml, 3,5 Gew.-% Triton X-100) wurde der Detergensgehalt mit steigenden Mengen an Polymer-Perlen herabgesetzt und anschließend mit jeweils 1,4 mol 12-PCSL/mol Protein inkubiert. Es ergab sich ein qualitativ ähnliches Verhalten wie im Fall von 12-CLSL. Wegen der Schwierigkeiten bei der Separierung der einander stark überlappenden spektralen Komponenten wurde hier auf eine Quantifizierung verzichtet. Die Werte wären wegen der unterschiedlichen Lipid/Protein-Verhältnisse ohnehin nicht mit den für 12-CLSL erhaltenen vergleichbar.

4.8.2. Mischungen von Triton X-100 mit SDS

Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) hat bekanntlich die Eigenschaft, die Tertiärstruktur von Proteinen aufzufalten (s. z.B. Tanford, 1980), was u.a. bei der Gelelektrophorese ausgenutzt wird. Der mitochondriale Adeninnukleotid-Translokator zerfällt in SDS unter Denaturierung in seine Monomeren, wobei auch der stabilisierende Inhibitor abgespalten wird. Während dieser Entfaltungs- und Dissoziationsvorgänge könnten weitere basische Aminosäuren als potentielle Bindungsstellen für negativ geladene Lipide freigelegt werden. Andererseits konkurriert natürlich das in hohem Überschuß anwesende Detergens mit den Lipiden um alle positiv geladenen Aminosäurereste. Daher erschien es sinnvoll, die Auswirkungen einer stufenweisen Zugabe von SDS auf die Cardiolipinbindung des AAC-Proteins zu untersuchen.

Hierzu wurde eine Probe des solubilisierten Proteins (4,9 mg/ml, 245 mol Triton X-100/mol Proteindimer) mit 0,6 mol 12-CLSL/mol Protein inkubiert und zur Kontrolle ein ESR-Spektrum aufgenommen. Um den Austausch gebundener und freier Lipidmoleküle etwas zu verlangsamen, wurde eine Temperatur von 20°C gewählt. Dieses Spektrum (A in Abb. 15) zeigt eine deutliche Immobilisierung des Lipids, wenn man es mit dem einer proteinfreien Kontrollprobe vergleicht (Spektrum F in Abb. 15). Anschließend wurden Aliquots von Probe A mit unterschiedlichen Mengen von SDS versetzt und wiederum ESR-Spektren aufgenommen. Man erkennt eine Amplitudenzunahme der mobilen spektralen Komponente (s. Abb. 15, B-E), was für eine sukzessive Freisetzung des immobilisierten Cardio-

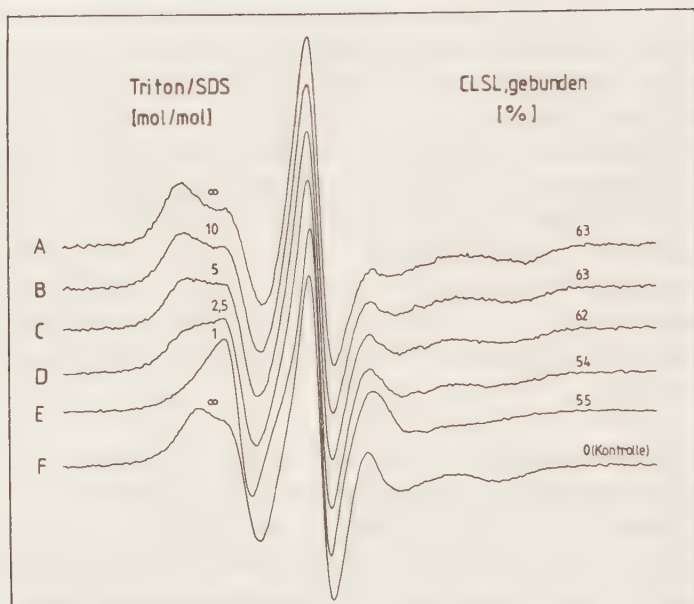


Abb.15

Einfluß von Natriumdodecylsulfat auf das ESR-Spektrum von 12-CLSL in Anwesenheit des AAC-Proteins.

Eine solubilisierete Proteinprobe (4,9 mg/ml in 1,1 Gew.% Triton X-100) wurde mit 0,6 mol 12-CLSL/mol AAC inkubiert und ein ESR-Spektrum bei 20°C aufgenommen (A). Zum Vergleich und zur Auswertung von Spektrum A diente das Spektrum einer proteinfreien Kontrollprobe (F). Die Proteinprobe wurde aufgeteilt und die Aliquots mit unterschiedlichen Mengen von SDS versetzt (Spektren B-E). Angegeben ist jeweils das Molverhältnis der beiden Detergentien. Der proteingebundene Lipidanteil wurde durch digitale Subtraktion ermittelt. Wegen der Variabilität der Linienform wurden Vergleichsspektren bei jeder der SDS-Konzentrationen aufgenommen. Trotz der großen Linienformänderung von A nach E nimmt die Lipidbindung des AAC nach SDS-Zugabe nur wenig ab.

lipins zu sprechen scheint.

Allerdings tritt hinsichtlich der Beurteilung und Auswertung dieser Meßreihe eine Komplikation auf: Am 12. C-Atom einer Fettsäurekette spinmarkierte Lipide liefern nämlich auch in Abwesenheit von Protein in gemischten Mizellen aus Triton X-100 und SDS "mobilere" Spektren als in reinen Triton-Mizellen (vgl. hierzu die Spektren E und F in Abb. 15).

Daher wurde zu jeder proteinhaltigen Probe eine Kontrollprobe mit gleichen Konzentrationen beider Detergentien angesetzt und deren Spektrum jeweils zur Subtraktion verwendet. Der in Anwesenheit des AAC jeweils immobilisierte Anteil der Spinsonde ist ebenfalls aus Abb. 15 ersichtlich. Trotz der starken, qualitativ erkennbaren Änderung der Linienform ist nur ein geringer Anteil des proteingebundenen Cardiolipins freigesetzt worden.

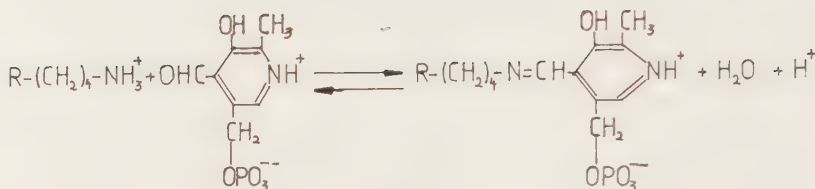
Eine Ausdehnung dieses Versuches zu höheren SDS-Konzentrationen erschien nicht sinnvoll, da die spektralen Komponenten dabei immer näher zusammenrücken, also schlechter aufgelöst sind. Die Ungenauigkeit bei der Subtraktion der Spektren nimmt also mit steigender SDS-Konzentration zu. Schon bei der Auswertung von Spektrum E in Abb. 15 bereitete die Festlegung des Subtraktionsendpunktes Schwierigkeiten.

Qualitative Versuche zeigten, daß bei einem SDS/Triton-Verhältnis von etwa 2 mol/mol Einkomponentenspektren auftreten. Ob diese durch Verdrängung des gebundenen Phospholipids oder durch Beschleunigung des Austausches mit den freien Lipidanteil zustandekommen, konnte nicht entschieden werden (s. Diskussion).

4.9. Chemische Modifikation basischer Aminosäuren am AAC

Es wurde bereits gezeigt, daß die Bindung negativ geladener Lipide am AAC-Protein teilweise elektrostatischer Natur ist. Daher war es naheliegend, den Einfluß einer chemischen Modifikation der unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin auf diese Bindung zu untersuchen; zu bevorzugen waren Modifizierungsreaktionen, die zum Verlust der positiven Ladung der betreffenden Seitenkette führen.

Für die spezifische Markierung der Lysinreste des AAC ist das Reagens Pyridoxal 5-Phosphat (PLP) bereits erfolgreich eingesetzt worden (Bogner et al. 1982, 1986). Dabei läuft die Reaktion



ab. Die gebildete Schiff'sche Base besitzt eine negative Nettoladung und dürfte deshalb kein negativ geladenes Lipid mehr binden. Sie kann durch Reduktion mit NaBH_4 stabilisiert werden, so daß eine Sequenzierung des modifizierten Proteins möglich wird. Da jedoch NaBH_4 in hohem Überschuß langsam die Nitroxylgruppe spinmarkierter Moleküle angreift, wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Reduktionsschritt verzichtet. Das hat auch den Vorteil, daß dann die Reaktion nachträglich durch den Zusatz eines Überschusses an freiem Lysin umgekehrt werden kann (Ronchi et al., 1969). Im Fall des mitochondrialen ADP/ATP-Translokators liegt das Gleichgewicht obiger Reaktion offenbar nicht so eindeutig wie gewöhnlich angenommen auf der Seite der Produkte. So konnten Bogner et al. (1986) mit einer Konzentration von 6 mM PLP noch keine Sättigung des Pyridoxalphosphat-Einbaus beobachten. Daher wurde in dieser Arbeit zusätzlich zu den üblichen 6 mM auch eine Konzentration von 50 mM PLP angewendet, um die diesem Reagens zugänglichen Lysinreste möglichst vollständig zu blockieren.

Dabei war auch die Beständigkeit der Inhibitorbindung während der Modifizierung zu prüfen (s. Anhang). Bei Vorinkubation mit dem spinmarkierten Inhibitor CATSL wurde durch 50 mM PLP knapp die Hälfte des zuvor gebundenen Inhibitors freigesetzt. Der unmarkierte Inhibitor CAT hat eine kleinere Dissoziationskonstante als CATSL und dürfte daher weniger leicht verdrängbar sein; bis zu Konzentrationen von 8 mM PLP wird die CAT-Bindung des AAC nicht angegriffen (Bogner et al., 1986).

Proben des solubilisierten AAC-Protein (3 mg/ml) wurden mit NaOH auf pH-Werte von 8,5 bzw. 10,0 gebracht und anschließend mit 2,4 mol 12-CLSL/mol Protein inkubiert. Nach Aufnahme von Kontrollspektren wurde PLP zugegeben (6 bzw. 50 mM) und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Wirkung dieser chemischen Modifikation des Proteins auf seine Fähigkeit, Lipide zu binden, wurde wieder ESR-spektroskopisch untersucht. Abschließend wurde beiden Proben ein Überschuß von freiem Lysin über das vorhandene PLP zugesetzt, um die Reaktion umzukehren (s. Tabelle 7). Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte durch Subtraktion der mobilen Lipidkomponente sowie zur Absicherung zusätzlich durch Intersubtraktionen der Spektren einer Meßreihe; die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7. Einfluß einer Modifikation des AAC mit PLP auf seine Cardiolipinbindung

PLP [mM]	Lysin ¹ /mM	12-CLSL, immobilisiert [%] bei	
		pH 8,5	pH 10
-	-	72	69
6	-	64	61
6	30	73	69
50	-	53	52
50	100	66	64

¹ Der pH der jeweils 1 M Lysin-Stammlösungen wurde zuvor auf einen Wert von 8,5 bzw. 10 eingestellt.

Durch chemische Modifikation der zugänglichen Lysinreste unter Ladungsumkehr wurde also offenbar ein Teil der Bindungsstellen für Cardiolipin blockiert. Dessen gebundener Anteil stieg nach Lysinzugabe wieder an, da die Bildung der Schiff'schen Base ein reversibler Vorgang ist. Im letzten Versuchsansatz (50 mM PLP) lag nur ein doppelter molarer Überschuß von freiem Lysin über das Pyridoxalphosphat vor. Trotz der Konkurrenz der freien Aminosäure um das Modifizierungsreagens befand sich letzteres weiterhin auch im Gleichgewicht mit den Lysinresten des AAC-Proteins, deren Gesamtkonzentration in diesem Versuch etwa 1 mM betrug. Die Lipidbindung blieb deshalb deutlich hinter dem Kontrollwert zurück (vgl. erste und letzte Reihe in Tabelle 7), während ein fünf-facher Überschuß von Lys über PLP zu einer in den Grenzen der Auswertegenauigkeit vollständigen Aufhebung des PLP-Effektes führte.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, daß das ESR-Spektrum von 12-CLSL in Triton X-100 in Gegenwart von freiem Lysin keinen Hinweis auf eine Immobilisierung des spinmarkierten Lipids liefert, solange kein Protein anwesend ist. Man kann zwar vermuten, daß die beiden entgegengesetzt geladenen Moleküle elektrostatisch aneinander binden; ein solcher Komplex wäre aber mit einer Molmasse von ca. 1650 zu klein, um zu einer im ESR-Spektrum nachweisbar herabgesetzten Mobilität des Phospholipids (Molmasse $\approx$ 1500) zu führen.

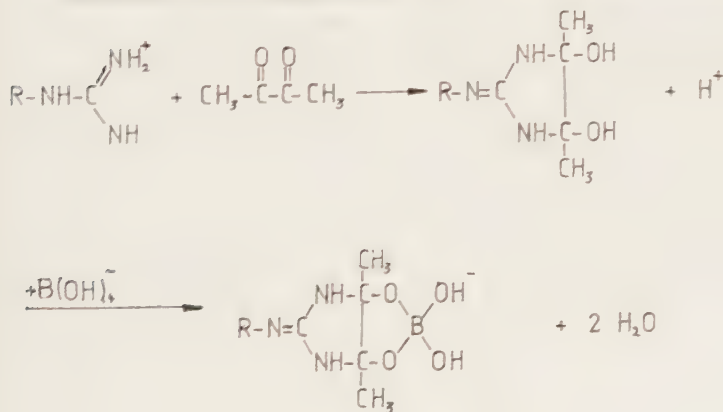
Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten pH-Werten läßt sich den Daten nicht entnehmen. Die etwas geringere Bindung bei höherem pH kann z.B. mit der Verdünnung der Proteinprobe bei der pH-Erhöhung erklärt werden, die nach Inkubation mit 12-CLSL zu einem erhöhten tatsächlichen Lipid/Protein-Verhältnis führte.

In weiteren, qualitativen Versuchen stellte sich heraus, daß die Reihenfolge der Zugabe von PLP, Lysin und spinmarkiertem Phospholipid ohne Einfluß auf die resultierende Lipidbindung ist. Die beteiligten Reaktionen sind also offenbar im Gleichgewicht; für das System AAC-Protein/PLP war dies bereits von Bogner et al. (1986) demonstriert worden.

Auch die durch den AAC hervorgerufenen Immobilisierung von 12-PCSL wird durch Umsetzung von Lysinresten herabgesetzt. So waren bei pH 10 und 2,7 mol PCSL/mol Protein 24% der Spinsonde immobil. nach Behandlung mit 50 mM PLP waren es nur noch 14%. Obwohl Phosphatidylcholin keine Nettoladung besitzt, sind mikroskopische Wechselwirkungen zwischen seiner Phosphatgruppe und positiven Ladungen an einer Proteinoberfläche denkbar (s. Diskussion).

Außer Lysin ist auch Arginin in der Sequenz des AAC überdurchschnittlich oft vertreten (23^{-1} bzw. 17-fach pro Monomer). Für dessen chemische Modifikation wurden bisher Phenylglyoxal (Klingenberg & Appel, 1980) sowie zusätzlich 2,3-Butandion (Block et al., 1981) eingesetzt. Phenylglyoxal reagiert mit der Guanidogruppe des Arginins unter Bildung eines 2:1-Komplexes (Takahashi, 1968), dessen Struktur noch unbekannt ist. Bei sterischer Hinderung wurden auch 1:1-Komplexe gefunden (z.B. Borders & Riordan, 1975; Vanoni et al., 1987). Auch beim AAC genügt nach Block et al. (1981) der Einbau eines Moleküls Phenylglyoxal pro Proteindimer zur vollständigen Unterdrückung der Atraktiosidbindung. Nach Langzeitinkubation mit hohen Konzentrationen kann Phenylglyoxal auch Lysin- und Cysteinreste angreifen (Takahashi, 1968). Ein freier Amino-Terminus wird stets desaminiert.

Das Diketon 2,3-Butandion (Diacetyl) bildet mit Arginin eine 1:1-Additionsverbindung, die durch Borat-Ionen stabilisiert wird (Riordan, 1973; Peters et al., 1981):



¹Ein Trimethyllysin in Position 51 der Aminosäuresequenz wurde dabei

Dabei verschwindet die positive Ladung des modifizierten Argininrestes. Auch in Abwesenheit einer Aminosäure bildet Butandion einen Komplex mit Borat, wodurch der pH-Wert abnimmt (Riordan, 1973); dieser muß daher nach Auflösung des Reagens' eingestellt werden. Die Spezifität für Arginin ist im allgemeinen besser als beim Phenylglyoxal (Block et al., 1981); in einem Sonderfall wurde allerdings auch die Modifikation eines Histidins durch Butandion beobachtet (Petz et al., 1979).

In der vorliegenden Arbeit wurde 2,3-Butandion zur chemischen Modifikation der Argininreste des AAC bevorzugt, da es ein definiertes, in Boratpuffer stabiles Produkt bildet. Atraktylesid dissoziiert in Gegenwart von 5 mM Butandion nur sehr langsam von seiner Bindungsstelle ab (Block et al., 1981). Da der CAT-AAC-Komplex eine um mindestens eine Größenordnung niedrigere Dissoziationskonstante besitzt als der entsprechende ATR-Komplex (Klingenberg, 1985), wird dieser Inhibitor auch durch 10 mM Butandion kaum verdrängbar sein. Tatsächlich wurde für das spinmarkierte Analogon CATSL unter diesen Bedingungen nach 2 h keine, nach 3 d nur etwa 10% Freisetzung beobachtet.

Das käufliche Diacetyl wurde frisch destilliert und 100 mM Stammlösungen in Boratpuffer auf pH 8,5 bzw pH 10,0 eingestellt. Eine solubilisierete Proteinprobe (3 mg/ml) wurde ausgiebig gegen 100 mM Boratpuffer mit 1 Gew.% Triton X-100 dialysiert. Nach Aufteilung dieser Probe wurde mit 10 mM Butandion 1 h bzw. 14 h inkubiert, während ein Teil zur Kontrolle unbehandelt blieb. Der Überschuß an Reagens wurde durch 20-stündige Dialyse gegen den Boratpuffer entfernt. Die drei Proben wurden anschließend mit jeweils 2,4 mol 12-CLSL/mol Protein inkubiert. Nach Aufnahme der ESR-Spektren wurden die modifizierten Proben zusätzlich mit Pyridoxalphosphat behandelt. Die Auswertung der fünf Spektren mittels digitaler Subtraktion ergab eine deutliche Abnahme des gebundenen Lipidanteils nach der Modifikation, die sich auch qualitativ an den Spektren erkennen ließ. Die Umsetzung verläuft offenbar langsam, da Langzeitinkubation einen erheblich größeren Effekt ergab (s. Tabelle 8). Nachträgliche Behandlung mit PLP führte zu einer

weiteren Abnahme der gebundenen Lipidmenge. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß tatsächlich von beiden Reagentien unterschiedliche Aminosäuren des AAC modifiziert wurden und daß sowohl Lysin- als auch Argininreste an der Bildung der AAC-CL-Komplexe beteiligt sind (s. Diskussion).

Tabelle 8. Die Wirkung einer Modifikation von Arginin- und Lysinresten auf die Cardiolipinbindung des AAC bei pH 8,5

Inkubationszeit mit 10 mM Butandion [h]	C _{PLP} [mM] (10 min Inkubation)	12-CLSL, immobilisiert [%]
-	-	67
1	-	59
14	-	45
1	6	48
14	50	31

Ein analoger, aber etwas umfassenderer Versuch wurde bei pH 10 durchgeführt. Damit sollte auch die Additivität der Wirkungen beider Modifizierungsreagentien quantitativ geprüft werden. Das nach ausgiebiger Modifizierung beider basischer Aminosäuren erhaltene Spektrum war kein eindeutiges Zweikomponentenspektrum mehr (s. Abb. 16). Eine geringe Restbindung kann aber nicht ausgeschlossen werden (s. Tabelle 9).

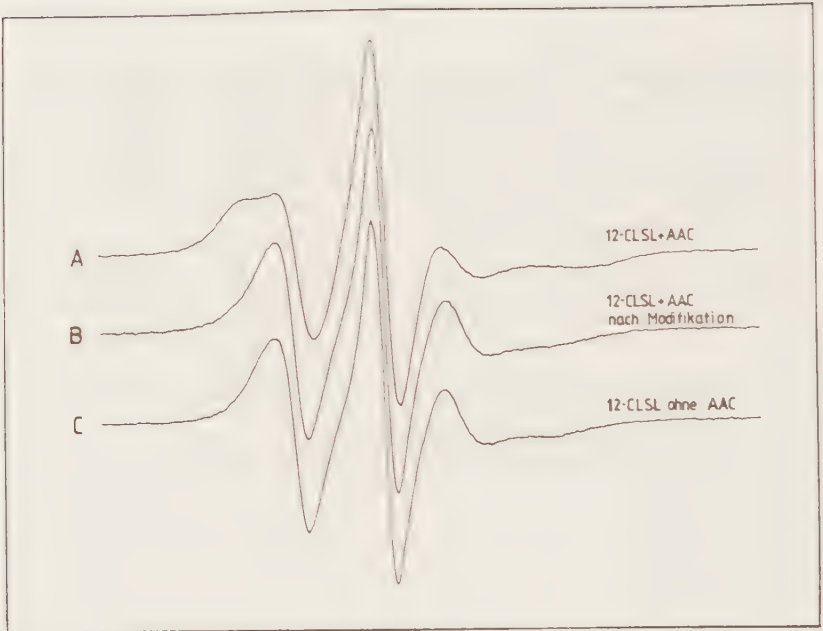


Abb. 16

Einfluß einer chemischen Modifikation basischer Aminosäuren des AAC auf die Bindung von 12-CLSL.

Spektrum A: Eine Proteinprobe (3,2 mg/ml) wurde gegen 100 mM Boratpuffer mit 1% Triton und pH = 10 dialysiert und anschließend mit 2,4 mol 12-CLSL/mol AAC inkubiert. Im Tieffeldbereich des ESR-Spektrums sind deutlich zwei Komponenten erkennbar.

Spektrum B: Eine entsprechende Probe wie in A wurde zunächst mit 10 mM 2,3-Butandion 23 h vorinkubiert. Das überschüssige Reagens wurde durch Dialyse entfernt und die Probe anschließend mit 50 mM Pyridoxalphosphat 10 min im Dunkeln umgesetzt. Erst dann wurde eine entsprechende Menge 12-CLSL wie in A zugegeben. Eine immobile Lipidkomponente ist nun nicht mehr klar aufgelöst.

Spektrum C zeigt die Linienform von 12-CLSL in Triton-Mizellen in Abwesenheit von Protein.

Alle drei ESR-Spektren wurden bei 30°C aufgenommen.

Tabelle 9. *Einfluß chemischer Modifizierungen des AAC-Proteins auf seine Cardiolipinbindung bei pH 10*

Inkubationszeit mit 10 mM Butandion [h]	C _{PLP} [mM] (10 min Inkubation)	12-CLSL, immobilisiert [%]	
		Bestimmung	Kombination ¹
-	-	56	-
-	6	46	-
-	50	32	-
1	-	52	-
23	-	29	-
1	6	43	42
23	6	19	19
1	50	24	28
23	50	≤10	5

¹ vgl. das Zahlenbeispiel im Text

Die Bindungswerte nach Doppelinkubation mit den beiden Reagentien (unterer Teil der Tabelle) ließen sich aus den Werten der entsprechenden Einfachinkubationen näherungsweise berechnen (Spalte 4). Diese wurden zunächst vom Kontrollwert (56% Bindung) subtrahiert, jeweils zwei dieser Differenzen wurden addiert und die Summe wiederum vom Kontrollwert abgezogen. Ein Zahlenbeispiel (vgl. Reihe 6 in Tabelle 9) mag den Gang bei dieser Rechnung verdeutlichen:

$$\text{Kontrolle} - / (\text{Kontrolle} - \text{PLP}) + (\text{Kontrolle} - \text{Diacetyl}) / \approx (\text{PLP} + \text{Diacetyl})$$

$$56 \quad - / (56 \quad - 46) + (56 \quad - 52) / \approx 43$$

Im Gegensatz zum Pyridoxalphosphat (s.o.) scheint 2,3-Butandion bei hohem pH-Wert vollständiger zu reagieren, so daß nach Doppelinkubation bei pH 10 eine (nahezu) völlige Blockierung der Bindungsplätze für Cardiolipin erzielbar ist.

4.10. Durch Phospholipide ausgelöste Aggregation des solubilisierten AAC-Proteins

Schon während der bereits beschriebenen Versuche zur Aufstellung der "Scatchard-Plots" und zur gegenseitigen Verdrängung der Lipide von der Proteinoberfläche war mehrfach eine Trübung der Proben beobachtet worden, jedoch nur in Gegenwart von Cardiolipin, Phosphatidsäure oder deren spinmarkierter Derivate. Dieser Beobachtung sollte nun intensiver nachgegangen werden. Dazu wurden einerseits weitere Versuche mit spinmarkierten Lipiden durchgeführt; andererseits sollte eine Spinmarkierung direkt am Protein angebracht werden, um dessen Aggregationsverhalten direkt und quantitativ verfolgen zu können. Zunächst wurde versucht, den Aggregationseffekt mit verschiedenen spinmarkierten Lipiden auszulösen. Durch Markierung des Proteins sollte dann festgestellt werden, welcher Bruchteil des solubilisierten AAC maximal durch Lipidzusatz ausgefällt werden kann und wieviel Lipid dazu nötig ist.

4.10.1. Abhängigkeit des Aggregationseffektes von der Lipidstruktur

In einer Versuchsreihe wurden Portionen einer Proteinprobe (6,1 mg/ml, 360 mol Detergens/mol Protein) mit äquimolaren Mengen der sechs spinmarkierten Lipide inkubiert. Das Molverhältnis Detergens/Lipid betrug also ebenfalls 360:1. Selbst wenn die zur Solubilisierung des AAC benötigten Detergensmoleküle abgezogen werden, bleibt ein 200-facher Überschuß über die spinmarkierten Lipide. Diese können unter diesen Bedingungen keinesfalls in Form von Liposomen ausfallen.

Eine Trübung zeigte sich nur nach Zugabe von 12-CLSL oder 12-PASL; in der CLSL-haltigen Probe bildeten diese Aggregate einen Niederschlag. Also scheinen nur negativ geladene Phospholipide diesen Effekt auszulösen. Jedoch konnte in den Proben, die 12-PGSL ($pK_s \approx 2,5$) bzw. 12-SASL ($pK_s \approx 5$) enthielten, keine Trübung beobachtet werden. Daher wurde in weiteren Ansätzen mit 2-, 5- und 10-fachen molaren Überschüssen an 12-SASL über das dimere AAC-Protein inkubiert. Auch dabei wurde keine sichtbare Proteinaggregation ausgelöst, ebensowenig durch einen vierfachen Überschuß an 12-PGSL.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß zwei negative Ladungen pro Molekül notwendig sind, um den AAC zu aggregieren. Es wurde daher

untersucht, ob die Kopfgruppe der Phosphatidsäure, α -Glycerophosphat, allein imstande ist, dieses Protein auszufällen. Dazu wurden Aliquots einer Probe des solubilisierten CATSL-AAC-Komplexes (4 mg/ml, 313 mol Triton X-100/mol Protein) mit unterschiedlichen Mengen α -Glycerophosphat inkubiert. Wegen dessen Wasserlöslichkeit war von vornherein zu erwarten, daß im Vergleich mit Lipiden, die sich wie das Protein nahezu ausschließlich in den Detergens-Mizellen aufhalten, eine um zwei Größenordnungen höhere Konzentration erforderlich sein würde. Aber sowohl ein 20-facher als auch ein 200-facher molarer Überschuß führte nach zwölfstündiger Inkubation und Zentrifugation weder zu erkennbaren Niederschlägen noch zu einer Trübung des Überstandes. Das heißt, daß auch die Anwesenheit der hydrophoben Fettsäureketten für den Aggregationseffekt eine Rolle spielt.

4.10.2. ESR-spektroskopische Untersuchung der Lipide in Protein-Lipid-Aggregaten

Da sich die durch CLSL oder PASL erzeugten Protein-Phospholipid-Aggregate als leicht zentrifugierbar erwiesen, bot sich eine nähere Untersuchung der in ihnen enthaltenen, immobilisierten Phospholipidmoleküle an. Außerdem war bereits im Zuge der Verdrängungsexperimente bemerkt worden, daß auch Lipide, die selbst keine Präzipitation verursachen, nach Zusatz von Cardiolipin teilweise in den Niederschlag gelangen und dort ebenfalls immobilisiert sind.

Proben des CAT-AAC-Komplex (6,0 mg/ml, 370 mol Triton X-100/mol Protein) wurden mit Filmen von 12-CLSL bzw. 12-PASL (1,5 bzw. 2,3 mol/mol Protein) geschüttelt und die sich bildenden Präzipitate abzentrifugiert (Sie sind bei derart geringen Lipidüberschüssen schon mit 2500 g klar zentrifugierbar, s. Abschnitt 4.10.3.) Die Niederschläge wurden mit detergentfreiem Proteinpuffer gewaschen und jeweils bei mehreren Temperaturen ESR-Spektren aufgenommen.

Zur Untersuchung mitgefällter Lipide wurden solubilisierter Proteinproben (5-7 mg/ml, 300-500 mol Detergens/mol Protein) zunächst mit Überschüssen von 12-PCSL, 12-PESL und 12-SASL inkubiert und anschließend durch eine dem AAC ungefähr äquimolare Menge an unmarkiertem Cardiolipin präzipitiert. Auch hier wurden die entstandenen Niederschläge abzentrifugiert und deren ESR-Spektren bei verschiedenen

Temperaturen aufgenommen.

In allen Fällen ergaben sich Einkomponentenspektren, deren Hyperfeinaufspaltung eine gegenüber dem durch Triton X-100 solubilisierten Zustand verminderte Beweglichkeit anzeigte. Auch die nach CL-Zusatz mitgefällten Lipide haben vermutlich Kontakt mit der Proteinoberfläche. Die Immobilisierung der spinmarkierten Lipide war je nach ihren Kopfgruppen unterschiedlich, wie man aus den Werten der Hyperfeinaufspaltung $2A_{zz}$ in Tabelle 10 entnehmen kann. Der Grenzwert von etwa 65 Gauss, wie er bei Rotationskorrelationszeiten der Spinsonde von über 10^{-7} s auftritt, wurde aber in keinem Falle erreicht. Also besitzen auch diese "immobilisierten" Lipidmoleküle noch einen beachtlichen Grad an Bewegungsfreiheit. Dafür spricht auch die deutliche Temperaturabhängigkeit (s. Tabelle 10), die bei 12-CLSL und 12-PASL etwa halb so groß ist wie für 12-SASL und 12-PCSL. Bei durch sterische Einflüsse immobilisierten Spinsonden ist die Temperaturabhängigkeit von $2A_{zz}$ viel geringer (vgl. Watts et al., 1981).

Tabelle 10. Hyperfeinaufspaltung spinmarkierter Lipide in Präzipitaten des AAC-Proteins

Temperatur [°C]	$2A_{zz}$ /Gauss für				
	12-CLSL ¹	12-PASL ¹	12-SASL ²	12-PESL ²	12-PCSL ²
-10	-	-	62,6±0,3	-	-
0	61,5±0,3	63,2±0,3	61,3 "	60,5±0,3	60,5±0,3
10	62,3 "	61,8 "	59,1 "	58,7 "	59,1 "
20	61,2 "	60,0 "	57,3 "	56,6±0,5	57,0 "
30	59,8 "	58,4 "	53,3±0,7	55,2 "	53,8±0,7
40	59,0 "	-	-	-	-

¹ Diese Phospholipide induzieren die Fällung des solubilisierten AAC.

² Diese Lipide wurden durch unmarkiertes Cardiolipin zusammen mit dem AAC-Protein präzipitiert.

Ein Vergleich der Werte für $2A_{zz}$ von Protein-Aggregaten und den immobilisierten spektralen Komponenten, die mittels Subtraktion aus Zweikomponentenspektren erhalten wurden (vgl. Abschnitt 4.2.), ergibt für 12-CLSL eine Zunahme um ca. 2 Gauss nach der Präzipitation. Die Spektren der Präzipitate konnten daher nicht zur Subtraktion der immobilisierten Komponente von den Spektren solubilisierter Proben (Abschnitt 4.2.) verwendet werden.

Unterhalb von etwa 55 Gauss wird die Messung ungenauer, da das Minimum im Hochfeldbereich dann nicht mehr exakt lokalisierbar ist. Nimmt man die Hyperfeinaufspaltung als Maß für die Festigkeit der Bindung der Lipide an den AAC, so zeigt sich auch hier die Sonderstellung der doppelt negativ geladenen Phospholipide Cardiolipin und Phosphatidsäure; besonders deutlich wird dies bei höheren Temperaturen.

4.10.3. Abhängigkeit der Protein-Aggregation vom Lipid/Protein-Verhältnis

Für die folgenden Experimente wurde nur Cardiolipin bzw. sein spinmarkiertes Derivat 12-CLSL herangezogen, weil es in der inneren Mitochondrienmembran, der natürlichen Umgebung des ADP/ATP-Translokators, in hoher Konzentration vorkommt. Die Phosphatidsäure ist auch wegen ihrer geringen Löslichkeit im verwendeten Detergens für diese Versuche schlecht geeignet.

4.10.3.1. Untersuchung der Präzipitation mittels spinmarkiertem Cardiolipin

Zunächst wurde die Verteilung von 12-CLSL auf Niederschlag und Überstand bei verschiedenen molaren Verhältnissen von Lipid zu Protein untersucht; bei der Berechnung dieses Verhältnisses, das im folgenden Text mit dem Buchstaben R abgekürzt wird, wird das an das gereinigte AAC-Protein gebundene mitochondriale Cardiolipin (Beyer & Klingenberg, 1985) nicht berücksichtigt.

Portionen einer Probe von solubilisiertem CAT-AAC-Komplex wurden mit verschiedenen Mengen 12-CLSL (0,5 - 5 mol/mol Protein) inkubiert. Eine Trübung entstand nur bei $R > 1$. Diese Proben wurden mit 2500 g in Kapillaren zentrifugiert; eine saubere Trennung ergab sich dadurch

allerdings nur für $R < 3$. Sonst blieben die Überstände getrübt, weil die Aggregate mit höherem Lipidgehalt offenbar eine geringere Dichte aufwiesen. Niederschläge und Überstände wurden getrennt ESR-spektroskopisch untersucht, wobei zunächst das Hauptaugenmerk auf die Amplitude des intensiven Signals im Zentrum des Spektrums (Übergang $m = 0$) gerichtet wurde. Sie diente als halbquantitatives Maß für die Menge des spinmarkierten Lipids (s. Abb. 17). Gewisse Fehler durch die unterschiedliche Linienform in den einzelnen Proben (vgl. Abschnitt 4.7.2) wurden dabei in Kauf genommen. Ein direkter Vergleich der Niederschläge mit den Überständen war wegen der unterschiedlichen Füllfaktoren und dielektrischen Verluste nicht möglich. Daher ließen sich nur qualitative Beziehungen feststellen.

Weitere Hinweise auf ein solches Aggregationsmaximum lieferte die Interpretation der Linienform im Tieffeldbereich (s. Abb. 18). Die Niederschläge mit $R < 2,15$ ergaben Einkomponentenspektren, deren Hyperfeinaufspaltung eine Immobilisierung der Spinsonde anzeigt. Für $R = 3,2$ war eine kleine und für $R = 5,2$ eine sehr deutlich mobile Komponente erkennbar. Die Präzipitate enthielten bei $R > 3$ also auch mobile Lipidmoleküle. Die Spektren aller Überstände bestehen aus zwei Komponenten; auffallend ist jedoch, daß bei $R = 2,15$ (maximale Fällung) der immobilisierte Anteil kleiner ist als bei $R = 1,1$ und $R = 3,2$. Würde die Menge des aggregierten Proteins monoton mit R zunehmen, sollte mit steigendem R immer weniger mobiler (proteingebundener) CLSL im Überstand verbleiben. Daher lieferten auch die Spektren der Überstände ein Indiz für eine Wiederauflösung der Aggregate durch überschüssiges Cardiolipin.

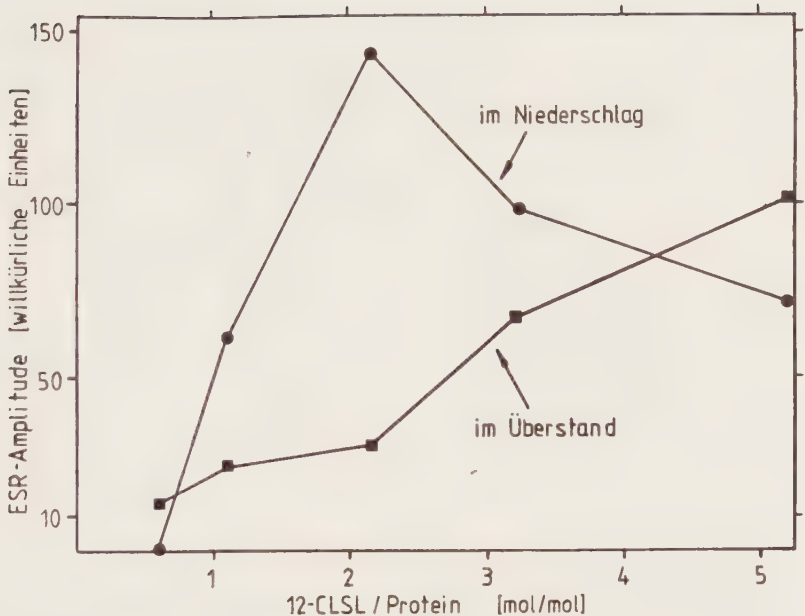


Abb. 17

Verteilung von spinmarkierten Cardiolipin nach lipidinduzierter Präzipitation des AAC.

Eine solubilisierter Proteinprobe (5,3 mg/ml in 1,6 Gew.-% Triton X-100) wurde in Aliquots aufgeteilt, die mit verschiedenen Mengen an 12-CLSL 24 h lang inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben in Glaskapillaren mit 2500 g 10 min zentrifugiert und die Überstände abgehoben. Nach Aufnahme der ESR-Spektren von Niederschlägen und Überständen (vgl. Abb.18) wurde jeweils die intensivste Linie (Spinübergang bei $m=0$) ausgemessen und deren Amplitude als halbquantitatives Maß für die Menge an CLSL gegen das Lipid/Protein-Verhältnis aufgetragen; letzteres bezieht sich auf die Gesamtprobe vor der Zentrifugation.

Maximale Präzipitation des Cardiolipins trat bei einem Wert von etwa 2 mol CLSL/mol AAC auf (s.Text).

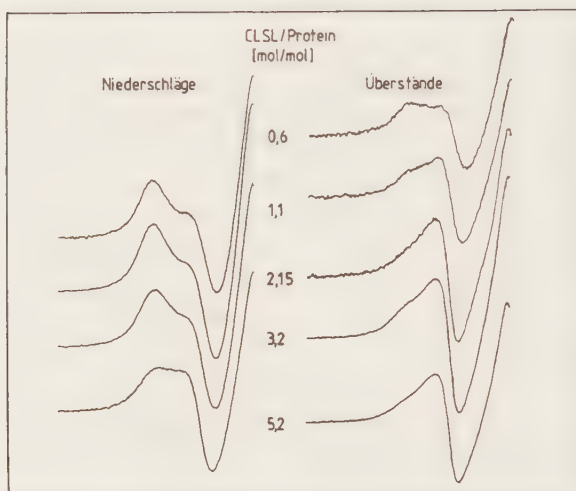


Abb. 18

Linienform von 12-CLSL nach teilweiser Präzipitation des AAC in Niederschlägen und Überständen.

Die Abb. zeigt die Tieffeldregion der ESR-Spektren, deren halbquantitative Auswertung in Abb. 17 dargestellt wurde. Das spinmarkierte Cardiolipin in den abzentrifugierten Niederschlägen ist bis zu einem Lipid/Protein-Verhältnis von 3 fast völlig immobilisiert. Bei fünffachem Cardiolipinüberschuß in der Gesamtprobe war die Sedimentation unvollständig, was sich durch eine Trübung des Überstandes und die Linienform im ESR-Spektrum des Niederschlages bemerkbar machte. Bei den Überständen tritt bei 2,15 mol CLSL/mol AAC die relativ geringste immobilisierte (proteingebundene) Lipidkomponente auf (vgl. Text).

Die Signalintensität in den Überständen stieg monoton mit steigendem R. Für die Niederschläge ergab sich ein klar erkennbares Maximum bei $R = 2,15$, welches mit einem Knick in der Kurve der Überstände korrespondiert. In dieser Probe war also ein Großteil des AAC-Proteins präzipitiert. In den Proben mit höherem Lipidüberschuß waren die Signalamplituden in den Niederschlägen gering; es hatten sich also weniger zentrifugierbare Proteinaggregate gebildet.

Sicher hat die unvollständige Sedimentation der lipidreichen Proteinaggregate zu den in Abb. 17 gezeigten Kurvenverläufen beigetragen. Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß das Auftreten eines ausgesprochenen Präzipitationsmaximums allein darauf zurückzuführen ist. Die schlechte Trennbarkeit von Niederschlag und Überstand führte nämlich nicht nur

zum Verbleib von Proteinaggregaten im Überstand (erkennbar durch die Trübung), sondern auch dazu, daß mobiles Cardiolipin in den Niederschlag gelangte (vgl. Spektrum bei $R = 5,2$, Abb. 18). Tendenziell (nicht quantitativ) sollten sich diese Fehler also ausgleichen.

4.10.3.2. Untersuchung der Präzipitation des spinmarkierten

AAC-Proteins

Um die Verteilung des AAC-Proteins auf Niederschlag und Überstand direkt erfassen zu können, mußte eine Spinmarkierung in das Protein eingeführt werden. Hierfür standen zwei beschriebene Methoden zur Wahl, nämlich eine kovalente Markierung durch spinmarkierte Maleimidderivate (Munding et al., 1987) und der Einsatz des spezifischen Inhibitors CATSL (Munding et al., 1983). Dabei handelt es sich um ein spinmarkiertes Derivat von Carboxyatratylosid (CAT), welches sehr fest an das AAC-Protein bindet ($K_{\text{Diss}} < 10^{-8} \text{ M}$; Klingenberg, 1985) und dabei zu einer ungewöhnlichen Stabilisierung des Proteins führt. Die Bindung des Inhibitors CAT dient daher als wichtigstes Kriterium für das Vorliegen von nicht denaturiertem Translokatorprotein in der "c"-Konformation. Das spinmarkierte Analogon von CAT (CATSL) eignet sich ebenso gut zu diesem Zweck, da sein ESR-Spektrum in proteingebundenem Zustand sehr charakteristisch ist (Munding et al., 1983). Daher wurde für den folgenden Versuch der CATSL-AAC-Komplex präpariert (s. Methoden). Von der prinzipiell ebenfalls möglichen Markierung durch Maleimidderivate wurde Abstand genommen, da das AAC-Protein im "m"-Zustand recht instabil ist und die Maleimidbindung keinen guten Indikator für den Erhalt seiner Tertiärstruktur abgibt.

Analog zum in Abschnitt 4.10.3.1. beschriebenen Versuch wurden Aliquots einer Proteinprobe mit unterschiedlichen Mengen an Cardiolipin versetzt. Diese Meßreihe konnte aber bis zu wesentlich höheren Lipidüberschüssen ausgedehnt werden ($R = 63$); im Fall des 12-CLSL kamen so große Überschüsse wegen zu hohen Substanzverbrauchs und zu befürchteter Austauschverbreiterung der ESR-Signale nicht in Betracht. Nach vierstündiger Inkubationszeit wurden die Proben mit 25000 g zentrifugiert. Wieder wurden Niederschläge und Überstände getrennt und die Amplitude des ($m = 0$)-Signals des ESR-Spektren ausgewertet. Unter diesen Umständen ließ sich das Präzipitat wesentlich besser vom Überstand

abtrennen als bei dem unter 4.10.3.1. beschriebenen Experiment. Nur beim größten verwendeten Lipidzusatz blieb der Überstand getrübt; hier bestand nur noch ein 5,4-facher molarer Überschuß des Detergens über das Phospholipid.

Die Linienform aller ESR-Spektren war typisch für den protein-gebundenen Inhibitor CATSL, so daß Denaturierung während der Aggregation der Protein-Lipid-Komplexes ausgeschlossen werden konnte. Auch Fehler durch unterschiedliche Linienbreiten scheiden hier aus. Trotzdem war aus den oben genannten Gründen auch hier kein unmittelbarer Vergleich zwischen Niederschlägen und Überständen möglich. Da aber die Gesamtmenge an CATSL in allen Proben vor der Zentrifugation dieselbe war und eine Probe ohne CL-Zusatz, d.h. vollkommen solubilisiert, vermessen wurde, war eine Berechnung des in jeder Probe noch solubilisierten Anteils (x) nach

$$x = \frac{A_x}{A_0} \cdot 100 \quad (\text{in \%})$$

mit A_0 = Amplitude der Gesamtprobe, A_x = Amplitude im Überstand durchführbar. Für den präzipitierten Anteil (y) muß dann gelten

$$y = 100 - x.$$

Der Umrechnungsfaktor (f) von Amplitude im Niederschlag (A_y) auf den Prozentsatz des präzipitierten AAC kann für jede Probe nach

$$f = \frac{y}{A_y} = \frac{100 - x}{A_y}$$

berechnet werden. Für die endgültige Bestimmung des jeweils präzipitierten Anteils (s. Abb. 19, Kurve der Niederschläge) wurde dann der Mittelwert dieser Faktoren verwendet, wobei die letzten beiden Meßpunkte wegen größerer Abweichungen ausgeschlossen wurden. Nach dieser Aufarbeitung der Meßdaten ergab sich für alle neun Datenpunkte eine mittlere Summe (x + y) von 99,6% mit einer Standardabweichung (σ) von 6,9%, ohne die beiden letzten Punkte war $\sigma = 3,8\%$.

Man erkennt (s. Abb. 19), daß die Kurven für Niederschläge und Überstände recht gut korrespondieren. Allerdings scheinen die Werte für die Niederschläge etwas unsicherer, was durch Fehler bei der Positionierung

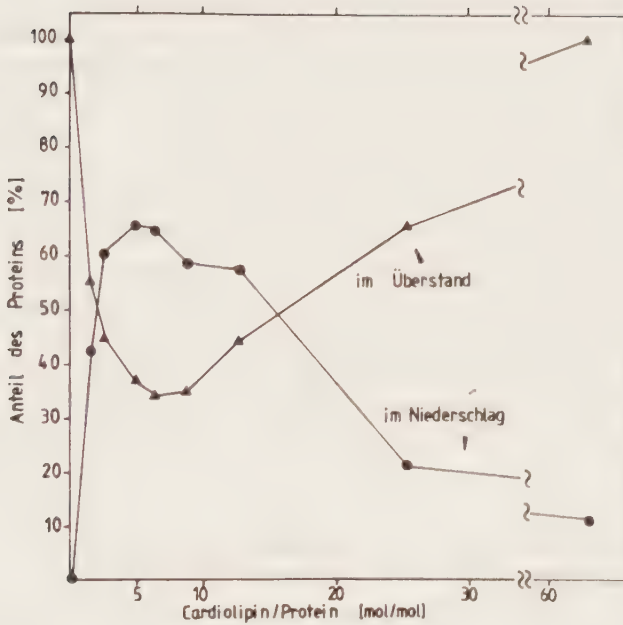


Abb. 19

Abhängigkeit der CL-induzierten Protein-Präzipitation von der Menge des zugegebenen Phospholipids.

Das AAC-Protein wurde zunächst mit dem spinmarkierten Inhibitor CATSL beladen (s. Methoden). Eine Probe mit 4 mg Protein/ml in 1,3 Gew.-% Triton X-100 wurde aufgeteilt und die Teilproben mit unterschiedlichen Überschüssen an unmarkiertem Cardiolipin 4 h inkubiert. Anschließend wurde in Glaskapillaren mit 25000 g 15 min lang zentrifugiert. Die Überstände wurden abgehoben und in frische Kapillaren überführt. Die Amplitude des bei 0°C aufgenommenen ESR-Spektren des spinmarkierten Inhibitors diente als quantitatives Maß für die Proteinmenge. Der genaue rechnerische Auswertungsgang wird im Text erläutert. Die Prozentangaben beziehen sich auf die in jeder Teilprobe vor der Zentrifugation vorhandene Menge des CATSL-AAC-Komplexes (6,1 nMol/100 µl).

der entsprechenden "punktförmigen" Proben und mögliche Verluste beim Pipettieren in die Kapillaren erklärt werden kann. Eine Doppelintegration der Spektren ergab einen - verglichen mit der beschriebenen Amplitudenmessung - ähnlichen, jedoch vermutlich wegen Störungen der Basislinie weit weniger glatten Kurvenverlauf.

Die Präzipitation des AAC-Proteins setzte erst bei $R \geq 1$, dann aber fast schlagartig ein. Eine maximale Fällung von rund 2/3 des eingesetzten Proteins konnte durch Zusatz eines vier- bis achtfachen molaren Überschusses an Cardiolipin erreicht werden. Bei höherem Lipidzusatz wurde eine allmähliche Auflösung der Präzipitate beobachtet. Qualitativ stimmen diese Ergebnisse also mit den im vorigen Abschnitt dargestellten überein, die Lage des Aggregationsmaximums war aber verschieden. Abgesehen von möglichen systematischen Fehlern (s.o.) hängt dies sicher mit der Art der verwendeten Spinmarkierung (am Lipid oder am Protein) zusammen, da nur deren Verbleib ESR-spektroskopisch erfaßbar ist (s. Diskussion).

4.11. Untersuchung der Mobilität des AAC-Proteins mit Hilfe der ST-ESR-Spektroskopie

Das konventionelle (V_1 -) ESR-Spektrum des proteingebundenen, spinmarkierten Inhibitors CATSL zeigt eine extrem große Hyperfeinaufspaltung (Munding et al., 1983); diese liegt in der Nähe des Grenzwertes für immobile Spinsonden ($\tau_r \geq 10^{-7}$ s). Man kann daher annehmen, daß mit Hilfe dieses spezifischen Inhibitors die Bewegung des AAC-Proteins selbst untersucht werden kann (vgl. aber Diskussion). Dafür eignet sich die Methode der ST-ESR-Spektroskopie, die von Horvath et al. (1988) bereits auf den membrangebundenen und den solubilisierten AAC angewendet wurde. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, daß das Protein sich in der Membran anisotrop bewegt, wie es für ein Membranprotein zu erwarten war.

Im Mittelpunkt dieses Teils der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung der Aggregate des AAC-Proteins. Zum Vergleich wurden zusätzliche ST-ESR-Messungen an Mitochondrien und am solubilisierten AAC-Protein vorgenommen. Das schien deshalb wichtig, weil hier ein anderer Resonator verwendet wurde als in der Untersuchung von Horvath et al. (1988).

4.11.1. Das AAC-Protein in Rinderherzmitochondrien

Da die innere Mitochondrienmembran die natürliche Umgebung des AAC-Proteins darstellt, erschien es sinnvoll, zunächst an diesem System Messungen vorzunehmen, um anschließend mögliche Veränderungen nach Solubilisierung bzw. Ausfällung des Proteins beurteilen zu können. Es ist mit dieser Meßmethode bereits von Horvath et al. (1988) untersucht worden, wobei neben dem Amplitudenverhältnis H''/H vorwiegend Integrale der ST-ESR-Spektren ausgewertet wurden. Hier sollten die effektiven Rotationskorrelationszeiten, die sich aus den Amplitudenverhältnissen im Tief-, Zentral- und Hochfeldbereich der Spektren ableiten lassen (s. Abb. 3 im Methodenteil), miteinander verglichen werden, um Aussagen über eine mögliche Anisotropie der Proteinbeweglichkeit zu gewinnen.

Dazu wurde eine möglichst konzentrierte Probe hergestellt (Zentrifugation in der Meßkapillare) und bei drei verschiedenen Temperaturen vermessen. Die konventionellen ESR-Spektren (s. Abb 23) zeigen die von Munding et al. (1983) beschriebene charakteristische Linienform und belegen eine starke Immobilisierung der Spinsonde. Den ST-ESR-Spektren (vgl. Abb. 21) wurden die üblichen Parameter entnommen und aus diesen anhand der Eichkurven (s. Abb. 4 im Methodenteil) die effektiven Rotationskorrelationszeiten bestimmt.

Für ST-ESR-Experimente sind Punktproben prinzipiell vorzuziehen, weil sie sich im Zentrum des Resonators positionieren lassen und Feldstärke und Sättigung über das Volumen der Probe als konstant angenommen werden können (Fajer & Marsh, 1982). Linienproben liefern demgegenüber weniger verrauschte Spektren. Hier werden die Ergebnisse beider Probenkonfigurationen vorgestellt; die Trends bzgl. Anisotropie und Temperaturabhängigkeit stimmen überein, wenngleich quantitative Unterschiede erkennbar sind.

Die drei Effektivwerte von τ_r unterscheiden sich stark voneinander, was für eine anisotrope Bewegung der Spinsonde spricht. Eine deutliche Temperaturabhängigkeit ergab sich nur für die schnellere Komponente, die durch den Parameter C'/C repräsentiert wird. Daher nahm die Diskrepanz der τ_r -Werte mit steigender Temperatur zu. Allerdings muß die relativ geringe Genauigkeit der Methode berücksichtigt werden; besonders im Hochfeldbereich war das Verhältnis von Signalintensität zum Rauschen recht ungünstig, weshalb hier für das entsprechende Amplitudenverhältnis eine Stelle weniger angegeben wird.

Tabelle 11. Spektrale Parameter und effektive Rotationskorrelationszeiten für den AAC in Rinderherzmitochondrien

<u>Punktprobe</u>	L''/L	$\tau_r(L''/L)$	C'/C	$\tau_r(C'/C)$	H''/H	$\tau_r(H''/H)$
Temp. [°C]		[μs]		[μs]		[μs]
30	0.86	22	-0.33	1	0.5	13
15	0.80	18	-0.13	4	0.4	9
0	0.75	15	+0.23	28	0.6	21
<u>Linienprobe</u>	L''/L	$\tau_r(L''/L)$	C'/C	$\tau_r(C'/C)$	H''/H	$\tau_r(H''/H)$
Temp. [°C]		[μs]		[μs]		[μs]
30	0.73	16	-0.29	1	0.5	13
15	0.73	16	-0.12	3	0.3	7
0	0.76	18	+0.13	7	0.5	13

4.11.2. Das in Mizellen von Triton X-100 solubilisierte AAC-Protein

Auch dieses System wurde bereits von Horvath et al. (1988) untersucht, jedoch ebenfalls mit einem anderen Meßgerät und abweichender Auswertungsmethodik. Da beides die Ergebnisse beeinflussen kann, wurden eigene Messungen vorgenommen.

Der AAC wurde als Atraktylosid-Komplex isoliert, das ATR durch CATSL verdrängt und die Proteinkonzentration mittels Druckdialyse auf 4 mg/ml erhöht. Dennoch ergab sich in den ST-ESR-Spektren ein erheblich störender Rauschpegel. Bereits bei 0°C war die Mobilität der Spinsonde so hoch, daß nur Obergrenzen für die Rotationskorrelationszeit zu erhalten waren: Die spektralen Parameter im Tief- und Hochfeldbereich ergaben $\tau_r \leq 1 \mu s$, aus dem Zentralbereich wurde $\tau_r \leq 0,1 \mu s$ abgeleitet; über eine mögliche Anisotropie der Proteinbewegung ist damit keine Aussage möglich. Die Bewegung war aber um mindestens eine Größenordnung schneller als in der Mitochondrienmembran.

Nach der Stokes-Einstein-Gleichung errechnet sich für die isotrope Rotation der ganzen Protein-Detergens-Mizelle bei 9°C $\tau_r = 0,4 \mu s$ (Beyer & Klingenberg, 1985). Horvath et al. (1988) geben bei 30°C einen Wert von 3 μs an, der aber ebenfalls nur als Obergrenze aufgefaßt werden kann.

4.11.3. Das aggregierte Protein

4.11.3.1. Präzipitation durch Entzug von Detergens

Bei Verminderung der Konzentration des Detergens Triton X-100 unter einen Wert von etwa 250 mol/mol Proteindimer fällt ein Teil des solubilierten AAC aus und kann abzentrifugiert werden. Dabei scheint das Protein nicht zu denaturieren, da der Inhibitor gebunden bleibt. Auf diese Weise lassen sich konzentrierte Proteinproben herstellen, da der Detergensgehalt der Niederschläge nur gering ist; allerdings bindet das Protein auch im Präzipitat noch verhältnismäßig viel Wasser (18 mg H₂O/mg Protein). Die Vermutung liegt nahe, daß es in diesen Präparaten wegen ihres geringen Gehalts an Detergens und (mitochondrialem) Phospholipid zu direkten Kontakten zwischen den Proteinmolekülen kommt. Eine solche Protein-Protein-Wechselwirkung könnte auch in der inneren Mitochondrienmembran eine Rolle spielen, da hier das Lipid/Protein-Verhältnis nur bei 0,34 g/g liegt (Colbeau et al., 1971). In rekonstituierten Membranen konnte dagegen ein Wert von 1,2 g Lipid/g AAC nicht wesentlich unterschritten werden (Beyer & Klingenberg, 1983). Daher wurde die ST-ESR-Methode zur Bestimmung der Proteinbeweglichkeit in den Aggregaten eingesetzt.

Gemessen wurde im Temperaturbereich zwischen -30°C und $+30^{\circ}\text{C}$. Die erhaltenen Spektren waren durchweg von höherer Qualität (d.h. weniger verrauscht) als es mit Membranpräparationen oder gar solubilisierten Proben erzielbar war (vgl. Abb. 21 sowie 23). Etwa bei -10°C froren die wasserhaltigen Proben ein, was sich leicht an der Verstimmung des Resonanzkreises erkennen ließ, ohne daß die Probe aus dem Resonator entfernt werden mußte. Bei Temperaturen oberhalb 0°C war eine starke Anisotropie in der Beweglichkeit der Spinsonde zu beobachten (s. Tabelle 12). Das Einfrieren führte zu einer Abnahme (!) der aus dem Tieffeldbereich der Spektren abgeleiteten effektiven Rotationskorrelationszeit, während $\tau_r(C'/C)$ davon nicht beeinflusst wird (s. Tabelle 12). Bei noch tieferen Temperaturen nähern sich die aus den drei diagnostischen Bereichen des Spektrums entnommenen τ_r -Werte einander an, so daß bei -30°C - im Rahmen der Meßgenauigkeit - eine langsame, isotrope Bewegung vorzuliegen scheint. Eine Auftragung von $\lg \tau_r$ gegen T^{-1} (Gleichung von Arrhenius) ergab nur für die aus dem Parameter C'/C abgeleiteten Korrelationszeiten über den ganzen erfaßten Bereich eine Gerade; aus deren Steigung wurde eine Aktivierungsenergie von 75 kJ/mol berechnet. Die anderen spektralen Parameter lieferten nichtlineare Kurven (s. Abb. 20 sowie Diskussion).

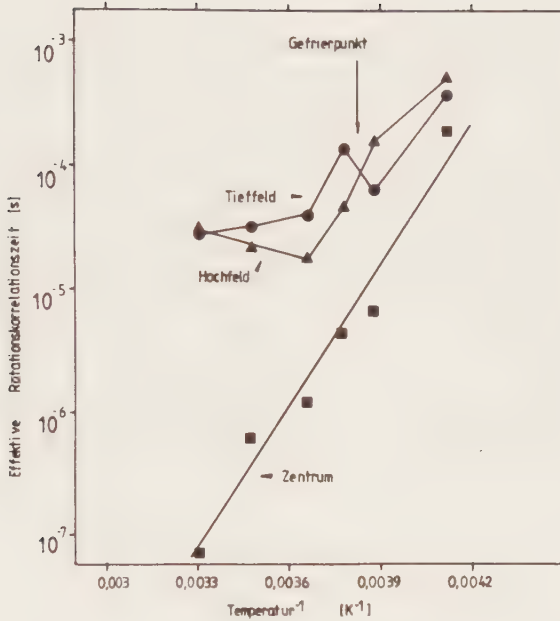


Abb. 20

Auftragung der drei effektiven Rotationskorrelationszeiten des präzipitierten AAC-Proteins nach der Arrhenius-Gleichung.

Der AAC wurde in seinen CATSL-Komplex umgewandelt (s. Methoden) und auf eine Konzentration von 4,5 mg/ml gebracht. Eine Ausfällung von etwa 1/4 der Proteinmenge wurde durch Verringerung der Detergengkonzentration auf 0,7 Gew.% Triton X-100 erzielt. Der abzentrifugierte Niederschlag wurde ST-ESR-spektroskopisch bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Den Spektren wurden die üblichen spektralen Parameter entnommen (s. Methoden) und daraus mit Hilfe der Kalibrationskurven (Abb. 4) Effektivwerte für τ_r

bestimmt. Diese wurden logarithmiert und gegen die Reziprokwerte der absoluten Temperatur aufgetragen. Nur für τ_r (Zentrum) ergab sich ein linearer Verlauf.

4.11.3.2. Präzipitation durch Zusatz von Cardiolipin

In Proben mit Detergens/Protein-Verhältnissen von 300 - 700 mol/mol läßt sich ein Großteil des solubilisierten AAC mit Hilfe von Cardiolipin oder Phosphatidsäure ausfällen (s. Abschnitt 4.10.). In einer Versuchsreihe wurden Portionen einer Proteinprobe (4 mg/ml, 344-molarer Detergensüberschuß) zu Filmen unterschiedlicher Mengen von Cardiolipin pipettiert und vier Stunden lang inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Protein-Phospholipid-Aggregate mit 25000 g abzentrifugiert und ST-ESR-spektroskopisch bei 0°C untersucht. Eine der Proben (CL/AAC = 4,8 mol/mol) wurde zusätzlich bei fünf weiteren Temperaturen vermessen (s. Abb. 21 und Tabelle 12). Bei Temperaturen um 0°C zeigen die Spektren ein charakteristisches "Hochplateau" im Bereich von L", das im isotropen Modellsystem von spinmarkiertem Hämoglobin (vgl. Abb. 3) nie auftritt.

Tabelle 12. Effektive Rotationskorrelationszeiten des aggregierten AAC-Proteins mit und ohne Cardiolipin-Zusatz¹

Temperatur [°C]	τ_r (Tiefeld) [μ s]		τ_r (Zentrum) [μ s]		τ_r (Hochfeld) [μ s]	
	ohne CL	mit CL	ohne CL	mit CL	ohne CL	mit CL
30	28	25	0,07	0,08	30	28
15	32	25	0,6	0,4	22	10
0	40	55	1,2	3,3	17	35
- 8	138	119	4,5	5	45	42
-15	63	75	6,7	56	158	178
-30	376	1000	188	400	500	1000

¹Die Meßwerte der diagnostischen Amplitudenverhältnisse (L"/L, C'/C, H"/H) wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen.

Die Temperaturabhängigkeit war sehr ähnlich wie im Fall der ohne Lipidzusatz hergestellten Präzipitate (s. Tab. 12). Bei hohen Temperaturen ist beinahe die gesamte Intensität im mittleren Teil des Spektrums konzentriert. Bei -30°C ist ein merklicher immobilisierender Effekt des Cardiolipins zu beobachten.

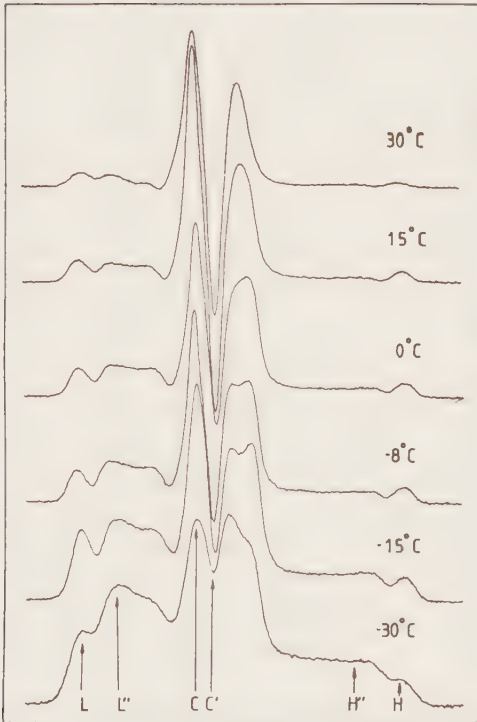


Abb. 21

Saturation Transfer-ESR-Spektren der durch Cardiolipin induzierten Aggregate des AAC-Proteins.

Eine Probe des CATSL-AAC-Komplexes (4 mg/ml, 1,3 Gew.-% Triton X-100) wurde mit einem 4,8-fachen molaren Überschuß von Cardiolipin 4 h inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde mit 25000 g abzentrifugiert und bei verschiedenen Temperaturen ST-ESR-spektroskopisch untersucht. Die spektralen Parameter werden wie in Abb. 3 definiert.

Der Gefrierpunkt der Probe lag bei -10°C .

Im Vergleich zu den Messungen an Mitochondrien (s. Tab.11) liegen die im Zentrum der Spektren ermittelten τ_r -Werte hier wesentlich niedriger, die übrigen in der selben Größenordnung. Daraus läßt sich in diesem Fall auf eine ausgeprägtere Anisotropie der Bewegung schließen.

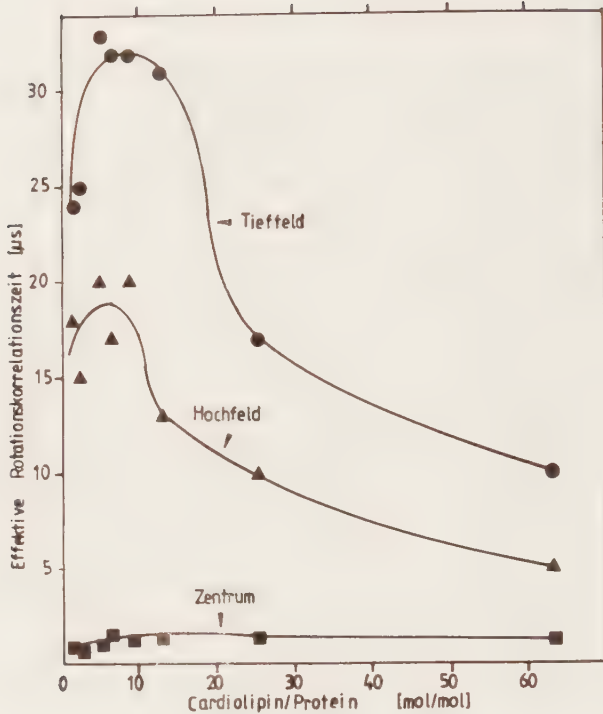


Abb. 22

Auftragung der effektiven Rotationskorrelationszeiten gegen das Lipid/Protein-Verhältnis vor der Präzipitation des AAC

Es wurden dieselben Proben wie in Abb. 19 untersucht. Die abzentrifugierten CATSL-AAC-Aggregate wurden bei 0°C ST-ESR-spektroskopisch vermessen. Effektivwerte für τ_r wurden aus den Spektren wie im Methodenteil und unter Abb. 20 beschrieben gewonnen. Für die Berechnung des CL/AAC-Verhältnisses wurde nur das extern zugegebene Cardiolipin berücksichtigt, die Werte beziehen sich auf die Gesamtprobe vor der Zentrifugation.

Die Maxima der beiden längeren Korrelationszeiten (L''/L, H''/H) korrelieren mit dem Maximum der Proteinaggregation (vgl. Abb. 19). Die "Wiederauflösung" der Aggregate geht mit einer Erhöhung der Proteinbeweglichkeit einher.

Eine Auftragung der bei 0°C anhand der drei spektralen Parameter ermittelten Rotationskorrelationszeiten gegen das totale Cardiolipin/Protein-Verhältnis (wobei nur das zugegebene Cardiolipin berücksichtigt wurde) zeigt für τ_r (L''/L) und τ_r (H''/H) deutliche Maxima

bei etwa 5-8 mol CL/mol AAC (s. Abb. 22). Bei weiterer Erhöhung der Lipidmenge nimmt die Beweglichkeit der Spinsonde etwa um das drei- bis vierfache zu, ohne aber die Werte für das Solubilisat (s. Abschnitt 4.11.2) zu erreichen. Dieser Effekt geht Hand in Hand mit der oben beschriebenen Wiederauflösung bzw. der geringeren Dichte (und damit schlechteren Sedimentierbarkeit) derartiger Aggregate (vgl. Abschnitt 4.10.3.2, Abb. 19).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluß einer teilweisen Substitution des Cardiolipins durch Lecithin, das allein keine Proteinaggregation auslöst, untersucht. Auch hier wurden Portionen einer Probe (4,25 mg Protein/ml, 270 mol Triton X-100/mol Protein) mit Lipidfilmen inkubiert; dabei wurde bei konstanter molarer Gesamtmenge nur das Verhältnis von CL zu PC variiert. Die entstandenen Präzipitate wurden abzentrifugiert und ST-ESR-Spektren bei 0°C aufgenommen. Wiederum deuten die Ergebnisse auf eine anisotrope Bewegung der Spinsonde hin, wobei die effektiven Korrelationszeiten bei 20 μ s bzw. 2 μ s liegen (s. Tabelle 13).

Tabelle 13. Einfluß von PC auf die effektiven Rotationskorrelationszeiten des aggregierten AAC-Proteins

Mol-% PC	Lipid/Protein [mol/mol]	CL/Protein [mol/mol]	τ_r (Tiefeld) [μ s]	τ_r (Zentrum) [μ s]	τ_r (Hochfeld) [μ s]
0	10,5	10,5	17	1,5	19
20	11,0	8,8	20	3,3	20
40	10,3	6,2	19	1,8	18
60	10,1	4,0	22	2,5	25
80	10,6	2,1	22	1,6	30
Mittelwert			20	2,1	22
Standardabweichung			2	0,8	5
σ [%]			10	38	23

Ein signifikanter Einfluß des beigemengten Lezithins auf τ_r konnte nicht nachgewiesen werden. Bei Cardiolipinüberschüssen von 2-10 mol/mol Protein, wie sie hier vorlagen, wurde in einem vorhergehenden Versuch maximale Proteinfällung beobachtet (s. Abschnitt 4.10.3.2., Abb. 19). Wieviel des vorgelegten Phosphatidylcholins allerdings tatsächlich in die Niederschläge gelangte, konnte nicht überprüft werden. Eine partielle Mitfällung von 12-PCSL durch CL wurde oben demonstriert (s. Abschnitt 4.10.2.).

Die Standardabweichungen in Tab.13 gestatten vorsichtige Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Methode. Diese ist im Tieffeldbereich am präzisesten, im Zentralbereich relativ am ungenauesten; allerdings ist hier die Signalintensität besonders hoch. Der Hochfeldparameter schließlich hat den Vorteil, daß nur der stark immobilisierte, mit Sicherheit proteingebundene Anteil des CATSL zu ihm beiträgt. (Zum Problem der spektralen Komponenten in CATSL-Spektren s. Diskussion.) Auch Squier & Thomas (1986a) fanden für $\tau_r(C'/C)$ einen größeren Gesamtfehler als für $\tau_r(L''/L)$ und $\tau_r(H''/H)$.

4.12. Untersuchung der Mobilität spinmarkierter Phosphatidsäure in Gegenwart des AAC mittels ST-ESR-Spektroskopie

Zu diesem Zweck wurde in am 5. C-Atom einer Fettsäurekette spinmarkierte Phosphatidsäure eingesetzt, da am Ende einer solchen Kohlenwasserstoffkette die effektive Rotationsgeschwindigkeit zu groß wird (s. Abschnitt 4.1).

Eine Probe von solubilisiertem CAT-AAC-Komplex (4,2 mg/ml, 250 mol Triton X-100/mol Protein) wurde durch Inkubation mit einem doppelten molaren Überschuß von 5-PASL zur Aggregation gebracht und zentrifugiert. Der Niederschlag wurde bei 0°C ST-ESR-spektroskopisch untersucht. Als Vergleichsprobe diente das gleiche spinmarkierte Phospholipid in 1 Gew.-% Triton X-100. Während für diese wegen zu schneller Rotation nur Obergrenzen für τ_r erhalten werden konnten, lieferte das Präzipitat konkrete Werte.

Tabelle 14. Effektive Rotationskorrelationszeiten spinmarkierter Phosphatidsäure in Gegenwart des AAC-Proteins

	L"/L	τ_r (L"/L) [μ s]	C'/C	τ_r (C'/C) [μ s]	H"/H	τ_r (H"/H) [μ s]
Aggregat	0,58	8	-0,49	0,6	0,5	12
Solubilisat	0,0	≤ 1	-1,15	$< 0,1$	0	≤ 1

Man erkennt im Präzipitat eine anisotrope, und zwar axiale (vgl. Marsh, 1980) Bewegung des Phospholipids (s. Tabelle 14). Gegenüber dem solubilisierten Lipid ergibt sich im präzipitierten Protein-Phospholipid-Aggregat eine Verlangsamung der Lipidbewegung um ca. eine Größenordnung. Im Vergleich mit der Gelphase, wo annähernd übereinstimmende effektive Korrelationszeiten von etwa 100 μ s aus den drei diagnostischen Parametern abgeleitet wurden (Marsh, 1980), ist das proteingebundene Phospholipid nicht besonders stark immobilisiert. Auch gegenüber dem AAC-Protein selbst (s. Abschnitt 4.11.) befindet sich das Lipid in rascherer Bewegung, was wegen seiner geringen Größe plausibel erscheint.

5. Diskussion

5.1. Behandlung von Lipid-Protein-Bindungs-gleichgewichten

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der "Lipidbindung" des solubilisierten Adeninnukleotid-Translokators im nicht-ionischen Detergens Triton X-100. Obwohl die funktionelle Rekonstitution dieses integralen Membranproteins in Phospholipidvesikeln bereits gelungen ist (Krämer & Klingenberg, 1977/1980) und mit diesen Präparaten auch Lipid-Protein-Wechselwirkungen untersucht worden sind (Beyer & Klingenberg, 1983), bietet das artifizielle System der Detergens-Protein-Mizelle für das Studium derartiger Wechselwirkungen gewisse Vorteile. So besteht Grund zu der Annahme, daß Detergentien eine geringere Affinität zu Membranproteinen aufweisen als die natürlich vorkommenden Phospholipide (Volwerk et al., 1987). Daher läßt sich eine Lipidselektivität eines solchen Proteins leichter vor dem Hintergrund eines Detergens als in einer Phospholipidmembran nachweisen. Weiterhin konnten mit den für das AAC-Protein entwickelten Einbaumethoden (Beyer & Klingenberg, 1983) bisher keine niedrigeren Phospholipid/Protein-Verhältnisse als etwa 100 mol/mol erzielt werden. Bei verschiedenen anderen Membranproteinen gelang dagegen eine weitergehende Konzentrierung in der Membran. Das Myelin-Proteolipid konnte sogar vollständig delipidiert werden, ohne zu denaturieren (Brophy et al., 1984). Dieses Protein läßt sich wie einige andere mit Hilfe ionischer Detergentien (in diesem Fall Natriumcholat) solubilisieren, die anschließend durch Dialyse entfernbar sind. Der AAC denaturiert dagegen in Cholat unter Abspaltung des stabilisierenden Inhibitors CAT (Hackenberg, 1979). Die Detergentien, in denen das AAC-Protein stabil ist (Triton X-100 und Alkylaminooxide) besitzen so kleine Kritische Mizellkonzentrationen, daß eine Abtrennung durch Dialyse praktisch nicht in Frage kommt. Die Entfernung von Triton X-100 mit Hilfe von Polymerperlen ist zwar möglich, gelingt aber nie vollständig, so daß auch die rekonstituierten Membranpräparationen des AAC-Proteins noch Reste dieses Detergens' enthalten.

Analog zu den rekonstituierten Membranen lassen sich auch in Detergentien mit ESR-Messungen relative Bindungskonstanten zur Charakterisierung der Kopfgruppenselektivität für Lipide bestimmen, wie es im

Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt wurde. In beiden Fällen erhält man über sämtliche "Bindungsplätze" gemittelte Daten. Aussagen über möglicherweise vorhandene spezifische Bindungsstellen für bestimmte Lipidspezies sind nicht ohne weiteres möglich. Nur wenn alle untersuchten Lipide um dieselben Bindungsstellen an der Proteinoberfläche konkurrieren und sich diese nicht sehr in ihrer Affinität unterscheiden, genügen diese relativen Bindungskonstanten, um ein realistisches Bild der Lipid-Protein-Wechselwirkung zu entwerfen.

Diese Voraussetzungen treffen besonders für einen weit verbreiteten Typ von Lipid-Protein-Wechselwirkungen zu, die Ausbildung einer Lipid-Grenzschicht ("boundary layer" in der englischsprachigen Literatur) um integrale Membranproteine. Die Lipidmoleküle dieser Grenzschicht, die zuerst von Jost et al. (1973) ESR-spektroskopisch nachgewiesen wurde, sind weniger mobil als die Moleküle der ungestörten Lipid-Doppelschicht, tauschen jedoch mit Zeitkonstanten von 10^{-7} - 10^{-6} s mit ihrer Umgebung aus (Ryba et al., 1987). Durch ESR-spektroskopische Untersuchungen der Lipid-Protein-Wechselwirkungen in zahlreichen natürlichen und rekonstituierten Phospholipidmembranen wurde bisher ausschließlich diese Art von "Lipidbindung" gefunden; die o.g. Voraussetzungen scheinen also für solche Systeme zuzutreffen.

Es gibt aber auch Hinweise auf spezifische Bindungsplätze für Phospholipide an Membranproteinen. Als Beispiel für eine Diskrepanz der mit unterschiedlicher Methodik erhaltenen Ergebnisse kann das Enzym Cytochrom c-Oxidase dienen, das besonders intensiv untersucht wurde. Zunächst stellten Robinson et al. (1980) fest, daß dieses integrale Membranprotein nach seiner Isolierung 2-3 fest gebundene Cardiolipin-(CL-)moleküle enthält, die nicht zu entfernen waren. Auch die Aktivierbarkeit nur durch CL wurde als Indiz für das Vorhandensein einer spezifischen Bindung dieses Phospholipids an Cytochrom c-Oxidase interpretiert. Später gelang dann die Entfernung des "internen" Cardiolipins bis auf geringe Reste (deutlich unter 1 mol Lipid/mol Protein), wobei die Aktivität erhalten blieb (Powell et al., 1985). Ein Versuch, den ESR-spektroskopisch erkennbaren immobilisierten Anteil von CLSL durch Zugabe von unmarkiertem CL zu beeinflussen, schlug fehl. Daraus schlossen die Autoren, daß auch Cardiolipin mit einer großen Zahl von "Bindungsstellen" an der Proteinoberfläche wechselwirkt; bei Vorliegen

von nur 2-3 spezifischer Bindungsstellen sollte nämlich das spinmarkierte Cardiolipin durch verhältnismäßig kleine Mengen von unmarkiertem CL verdrängbar sein. Powell et al. (1985) konnten ihre Daten am besten mit einer relativen Bindungskonstante von 5,4 für CL gegenüber PC bei einer Zahl von 50 Bindungsplätzen für PC und CL in Einklang bringen, wobei alle Bindungsstellen einer Klasse angehören. Dies deckt sich mit dem erwarteten Verhalten einer "boundary layer".

Am selben Protein - allerdings in mizelldisperser Form (in Cholat) - hatten Gwak & Powell (1982) nur 6 mol Lipid-Phosphor/mol Protein gefunden, was drei Bindungsstellen für Cardiolipin entspricht. Diese unterschiedlichen Ergebnisse führen zu der Folgerung, daß Protein-Lipid-Bindungsgleichgewichte auch davon abhängen können, ob ein Membranprotein in solubilisierter Form vorliegt oder in eine Phospholipidmembran eingebaut ist. Die Frage, ob diese Diskrepanz auf die Unterschiede im Aufbau von Phospholipid-Doppelschicht und Detergensmizelle oder auf die negative Nettoladung von Cholat zurückgeht, oder ob gar Konformationsänderungen der (oligomeren) Cytochrom c-Oxidase dabei eine Rolle spielen, muß bislang offenbleiben. Es ist allerdings bemerkenswert, daß bislang an keiner Membranpräparation mit Hilfe spinmarkierter Lipide spezifische Bindungsplätze gefunden wurden, auch wenn andere Experimente, z.B. zur Abhängigkeit der biochemischen Funktion der Proteine von bestimmten Phospholipiden, ihr Vorhandensein nahelegen.

Die Funktion kann natürlich auch durch Änderung allgemeiner Membraneigenschaften wie der Fluidität modifiziert werden. Dies scheint auch für die Aktivierung des Nucleotidaustausches durch Phosphatidylethanolamin (PE) zu gelten, die von Krämer & Klingenberg (1980) in Phospholipidvesikeln gemessen wurde. In der ESR-spektroskopisch gewonnenen Selektivitätsreihe (vgl. Abb. 6) findet sich PE an vorletzter Stelle. Auch durch Variation des Lipid/Protein-Verhältnisses sowie in Verdrängungsversuchen konnte (im Gegensatz zu CL und PA) kein Hinweis auf spezifische Bindungsstellen für PE gefunden werden. Ebensowenig löst dieses Phospholipid die Bildung von Aggregaten des AAC-Proteins aus (s. Abschnitt 4.10.1.).

Die hier vorgelegten Ergebnisse liefern Hinweise auf unterschiedliche Bindungsplätze für bestimmte Lipidklassen. Ein Indiz ist die unterschiedlich ausgeprägte Immobilisierung der "gebundenen" Lipidmoleküle,

die in den ESR-Spektren durch unterschiedliche Hyperfeinaufspaltungen erkennbar ist (vgl. Tabelle 10). Dies kann auch durch verschiedenen schnelle Austauschraten der einzelnen gebundenen Lipidspezies erklärt werden. In jedem Fall sollten die diese "Bindung" bewirkenden Anziehungskräfte (s. Abschnitt 5.2.) oder die Bindungsstellen verschieden sein; auch eine Kombination beider Ursachen wäre denkbar. In der Literatur über rekonstituierte Membranen wurden solche Unterschiede bislang nicht erwähnt.

Einen besseren Hinweis auf unterschiedliche Typen von Bindungsplätzen an der Oberfläche des AAC stellt die Diskrepanz zwischen den Selektivitätsreihen für Bindung und Verdrängung dar. Für spinmarkierte Fettsäure wurde gegenüber PCSL eine bedeutend höhere relative Bindungskonstante gefunden (s. Tabelle 2), doch benötigt man zur Verdrängung eines gegebenen Quantums CLSL mehr Fettsäure als Lezithin. Letzteres ließe sich mit dem etwa doppelt so großen Flächenbedarf des Lezithins gegenüber der Fettsäure erklären. (Nichtsdestotrotz beweist deren verhältnismäßig hohe relative Bindungskonstante eine gegenüber Lezithin bevorzugte Bindung an das AAC-Protein.) Anscheinend sind die Fettsäuremoleküle mit vielen Orten der Proteinoberfläche in der Art einer "boundary layer" assoziiert. Für Lezithin gilt prinzipiell dasselbe, wobei die Affinität des AAC für dieses Phospholipid geringer als die für Fettsäure ist. Im Gegensatz dazu scheinen für CL zusätzlich spezifische Bindungsplätze am AAC-Protein vorhanden zu sein (s.u.).

Einen "boundary layer"-Effekt muß man grundsätzlich für alle Lipide annehmen, wobei die Zahl der "Bindungsstellen" zwar immer relativ hoch ist, im einzelnen aber von der Größe der Lipidmoleküle abhängen könnte. Eine grobe Betrachtung der Molekülgröße ergibt für die Zahl der Bindungsstellen n_{Lipid} :

$$n_{\text{SA}} \approx 2n_{\text{PC}} \approx 2n_{\text{PE}} \approx 2n_{\text{PG}} \approx 2n_{\text{PA}} \approx 4n_{\text{CL}}$$

(Ob sie der Wirklichkeit entspricht, hängt auch von der Orientierung der Lipidmoleküle relativ zur Proteinoberfläche ab, welche sich direkt nicht beobachten läßt und selbstverständlich auch nichts Statisches ist.) Aus obiger Betrachtung folgt, daß der immobilisierte Anteil bei Fettsäure kaum vom Lipid/Protein-Verhältnis abhängt, solange dieses relativ klein gegenüber der Zahl der Kontaktstellen an der Proteinoberfläche ist (etwa 10-50 für verschiedene Membranproteine). Für Phospho-

lipide wäre diese "Sättigung" wegen ihres größeren Molekülquerschnitts evtl. eher erreicht,; auch bei ihnen wäre jedoch ein weit größerer Lipidüberschuß erforderlich, als an spinmarkierten Analoga ohne drastische Signalverbreiterung durch Heisenberg-Austausch zugesetzt werden kann. Bei starker Austauschverbreiterung der ESR-Signale wird aber die Auswertung der Spektren durch Subtraktion unmöglich. Eine reine "boundary layer"-Bindung führt also bei der hier gewählten Versuchsanordnung zu dem Effekt, daß der gebundene Lipidanteil (in %) vom Lipid/Protein-Verhältnis unabhängig ist. Tatsächlich wurde dieses Verhalten für SASL (s. Tabelle 5) und auch für die Phospholipide PCSL, PESL und PGS� beobachtet (Experimente nicht gezeigt). Dagegen zeigten die ESR-Spektren der doppelt negativ geladenen Phospholipide PASL und CLSL eine starke Abhängigkeit des gebundenen Lipidanteils vom Lipid/Protein-Verhältnis, und dies bereits im Untersuchungsbereich von 0,5 - 5 mol Lipid/mol Protein. Nur deshalb war eine Auswertung der Bindungsdaten nach Scatchard überhaupt möglich. Eine derartige Datenaufarbeitung findet sich in der gesamten ESR-Literatur zur Lipid-Protein-Wechselwirkung in Phospholipidmembranen nicht, eben weil in diesen Systemen nur der "boundary layer"-Typ von Lipid-Protein-Wechselwirkung beobachtet wurde. Dagegen bringen Volwerk et al. (1987) eine derartige Auftragung für die Bindung zweier Phospholipide an solubilisierter Cytochrom c-Oxidase.

Die Ergebnisse der Verdrängungsversuche in dieser Arbeit lassen sich folgendermaßen interpretieren: Unmarkiertes und spinmarkiertes Cardiolipin konkurrieren um dieselben wenigen Bindungsstellen; gebundener 12-CLSL läßt sich daher durch einen zwanzigfachen molaren Überschuß des unmarkierten CL weitgehend verdrängen. Daß es dennoch (anscheinend) nicht zu völliger Gleichgewichtseinstellung kommt (s. Ergebnisteil), kann drei mögliche Gründe haben: 1) Die Affinität des Phospholipids zum AAC-Protein wird durch die Spinmarkierung erhöht. 2) Ein zusätzlicher Anteil von in der Art einer "boundary layer" gebundenen CLSL-Molekülen, die erst bei weit höheren CL-Überschüssen verdrängbar sind, tritt zu den spezifisch gebundenen CL-Molekülen hinzu. 3) Es erfolgt während der Dauer des Experiments keine Gleichverteilung des nachträglich zugegebenen Phospholipids auf die Detergensmizellen. Tatsächlich ist die Konzentration an freien Phospholipidmolekülen in der wässrigen Phase sehr

gering; die Kritische Mizell-Konzentration für PC beträgt z.B. nur 0,5 nM (Tanford, 1980). Daher muß damit gerechnet werden, daß der Übergang von Phospholipiden von einer Mizelle zur anderen ein langsamer Vorgang ist. Ein solcher Austausch wäre nicht erforderlich, wenn schon bei der Auflösung der Lipidfilme eine Gleichverteilung auf proteinhaltige und reine Detergensmizellen erfolgte. Auch dies kann aber a priori nicht vorausgesetzt werden; die ans Protein "gebundenen" Detergensmoleküle besitzen möglicherweise ein herabgesetztes Solubilisierungsvermögen. Diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß beim jetzigen Kenntnisstand eine quantitative Interpretation von Phospholipid-Verdrängungsexperimenten fragwürdig bleiben müßte, weswegen in der vorliegenden Arbeit darauf auch verzichtet wurde (vgl. Abschnitt 4.3.). Weiterhin folgt aus diesen Betrachtungen, daß rekonstituierte Phospholipidmembranen für quantitative Kompetitionsversuche den mizell-dispersen Präparaten prinzipiell vorzuziehen sind. Die laterale Diffusion von Proteinen und Lipiden in Membranen ist nämlich gut untersucht. In der Praxis kommt dieser Vorzug indes nur dann zum Tragen, wenn eine völlig homogene Membranpopulation vorliegt, die unilamellar ist und nur aus einer Phospholipidspezies besteht. Abgesehen davon, daß auch ein solches System artifiziell wäre, bleiben noch die Schwierigkeiten bei der nachträglichen Zugabe von Lipid.

Von Dilyso-CL und Phosphatidsäure wird ans AAC-Protein gebundener 12-CLSL etwa gleich gut, und zwar etwas weniger effektiv als durch Cardiolipin selbst verdrängt. Man kann annehmen, daß die drei Phospholipide um dieselben Bindungsstellen konkurrieren, wobei deren Affinität auch von hydrophoben Wechselwirkungen abhängt, die mit der Zahl der Kohlenwasserstoffketten pro Lipidmolekül zunehmen (s. Abschnitt 5.2.). Wegen der hohen relativen Bindungskonstante der spinmarkierten Fettsäure würde man zunächst erwarten, daß proteingebundenes, spinmarkiertes Cardiolipin durch Stearinsäure ebenfalls leicht verdrängbar ist. Die experimentellen Ergebnisse (s. Abb. 7 und 8) widerlegen diese Vermutung jedoch. Daraus ergibt sich die Folgerung, daß die Bindungsstellen mit hoher Affinität für CL Fettsäuremoleküle mit weit geringerer Affinität binden. Die relativ hohe Bindungskonstante von 12-SASL muß daher durch Wechselwirkung mit anderen Orten der Oberfläche des AAC-Proteins zustandekommen. Da umgekehrt gebundener SASL durch Cardiolipin

durchaus verdrängbar ist, muß auch dieses, zusätzlich zu den ihm eigenen Bindungsstellen hoher Affinität, Zugang zu den Plätzen haben, an denen die Fettsäure sich aufhält; diese sind daher nicht für Fettsäure spezifisch. Eine solch unspezifische Bindung des "boundary layer"-Typs ist auch für PC, PE und PG anzunehmen. Diese Phospholipide zeigen aber im Unterschied zur Fettsäure kein unterschiedliches Verhalten in Kompetitionsexperimenten und Versuchen zur Bindungsspezifität: sie "binden" offenbar innerhalb der "boundary layer" mit geringerer Affinität als Fettsäuren.

Auch bei den Auswertungen nach Scatchard waren die Ergebnisse je nach Lipidklasse unterschiedlich. Für Cardiolipin ließen sich die Datenpunkte recht gut durch Ausgleichsgeraden repräsentieren (s. Abb. 11, Korrelationskoeffizient 0,98 bzw. 0,96), während sich für Phosphatidsäure bereits ein nach oben konkaver Verlauf der Kurve abzeichnet (s. Abb. 12). Für Stearinsäure blieb das Verhältnis gebunden/frei über den gesamten Untersuchungsbereich im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant (s. Tabelle 5); die von Scatchard (1949) angegebene Gleichung war daher nicht anwendbar, ein Effekt, der bereits als Hinweis auf eine große Zahl von Bindungsstellen mit hohen, aber nicht unbedingt gleichen Dissoziationskonstanten interpretiert wurde (s.o.). Diese unspezifischen Bindungsplätze sind aber auch für Phospholipide zugänglich und müßten sich bei entsprechender Auftragung durch ein steiles Ansteigen der Kurven zur Ordinate hin auswirken, wie es sich im Fall der Phosphatidsäure auch tatsächlich andeutet. Das Fehlen einer deutlichen Krümmung in den Kurven für Cardiolipin kann abgesehen von den Ungenauigkeiten dieser Auswertung mit einem starken Überwiegen des Einflusses der spezifischen Bindungsstellen gegenüber den unspezifischen erklärt werden. Daß die Zahl der "boundary layer"-Plätze für Cardiolipin aufgrund der Größe des Moleküls womöglich geringer ist als für Phosphatidsäure (s.o.), mag ebenfalls zu den unterschiedlichen Kurvenverläufen der beiden Phospholipide beigetragen haben. Für beide doppelt negativ geladenen Phospholipide wurden hingegen zwei spezifische Bindungsstellen gefunden.

Ebenfalls zwei Klassen von Bindungsstellen fanden Volwerk et al. (1987) mit einer ähnlichen Auftragung für PG an Detergens-solubilisierter Cytochrom c Oxidase, während die Datenpunkte für PC auf einer Gera-

den lagen.

Die im Ergebnisteil dieser Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten, K_{Diss} beziehen sich auf das gesamte Probenvolumen. Der größte Teil dieses Volumens wird von der wässrigen Phase eingenommen und steht den am Bindungsgleichgewicht direkt beteiligten Molekülen als Aktionsraum nicht zur Verfügung. Daß die Wasserphase dennoch nicht unwichtig ist, zeigen u.A. die Einflüsse von Ionenstärke und pH-Wert auf die beobachtbaren Lipid-Protein-Wechselwirkungen.

Um die K_{Diss} -Werte in eine mit anderen Bindungsgleichgewichten vergleichbare Form zu bringen, ist es sinnvoll, sie auf das Volumen der Detergens-Mizellen umzurechnen. Dafür gilt die Gleichung

$$K_{Diss, Det} = \frac{K_{Diss, Wasser}}{Gew. - \% Det \cdot \bar{V}} \cdot 100$$

Für das partielle spezifische Volumen ($\bar{V}$) von Triton X-100 bestimmte Hackenberg (1979) aus Dichtemessungen bei 23°C einen Wert von 0,908 cm³/g. Der Literaturwert für 25°C ist damit identisch. Er kann daher auch für die im Experiment herrschende Temperatur von 20°C eingesetzt werden, da andere, bereits in $K_{Diss, Wasser}$ eingegangene Fehler weit größer sind (s. Abschnitt 4.6.1.).

Damit ergibt sich für Cardiolipin $K_{Diss} = 2$ mM und für Phosphatidsäure $K_{Diss} = 3,5$ mM. Verglichen mit den Werten für die Bindung spezifischer Inhibitoren des AAC, die in der Größenordnung von 10⁻⁸-10⁻⁷ M liegen (Klingenberg, 1985) ist die Lipidbindung an dieses Protein also nicht sehr fest. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß Cardiolipin in der inneren Mitochondrienmembran in hoher Konzentration vorkommt. Daher könnte dort trotz relativ hoher Dissoziationskonstante ein stabiler Protein-Cardiolipin-Komplex vorliegen.

Eine alternative Erklärung für einen konkaven "Scatchard-Plot" stellt die Annahme einer kooperativen Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein dar, wodurch die Affinität der freien Bindungsstelle von der Besetzung anderer Plätze abhängig wird (Cantor & Schimmel, 1980). Eine solche Annahme ist jedoch im Fall der Lipidbindung des AAC-Proteins kaum zu rechtfertigen. Die Konformation dieses Protein wird durch die Bindung spezifischer Inhibitoren stabilisiert. Bei den in Abschnitt

4.6. beschriebenen Versuchen lag der AAC als Carboxy-Atraktulosid-(CAT-)Komplex vor; die Bindung von CAT wird durch Lipid-Protein-Wechselwirkungen nicht gelöst. Daher kann davon ausgegangen werden, daß durch die Bindung eines Moleküls Cardiolipin allenfalls kleine, lokale Konformationsänderungen induziert werden. Diese könnten nur dann zu einem kooperativen Effekt führen, wenn die Bindungsplätze für Lipide einander benachbart sind. Auch durch Lipid-Lipid-Wechselwirkungen an der Proteinoberfläche kann Kooperativität nur bei einander benachbarten Lipidmolekülen zustandekommen. Ein Abstand zweier Spinsonden unter 1,5 nm müßte aber zu dipolaren Wechselwirkungen führen, die anhand der ESR-Spektren hätten erkannt werden können.

Anders liegen die Verhältnisse bei Wechselwirkungen von Proteinen mit Detergentien, z.B. Natriumdodecylsulfat. Hier handelt es sich überwiegend um unspezifische, hydrophobe Wechselwirkungen; die Abgrenzung einzelner Bindungsstellen ist kaum möglich, da letztlich der ganze hydrophobe Teil der Proteinoberfläche mit Detergensmolekülen umgeben wird, die sich überdies in rascher Bewegung befinden. Daher ist eine Kooperativität auch dann vorstellbar, wenn es nicht zu größeren Konformationsänderungen kommt. (Bei SDS dürfte das allerdings meist der Fall sein, da dieses Detergens bekanntlich Membranproteine auffaltet und damit denaturiert.) Tatsächlich wurde eine stark kooperative Bindung von SDS an Proteine experimentell gefunden (Tanford, 1980). Auch bei der Solubilisierung von Membranproteinen scheint Kooperativität eine Rolle zu spielen.

5.2. Die Art der an der Lipid-Protein-Wechselwirkung beteiligten Kräfte

Außer allgemeinen Bindungsdaten liefert die vorliegende Arbeit auch Aussagen über die Art der für die beobachtete Bindung ursächlichen Lipid-Protein-Wechselwirkung. Eine Beteiligung elektrostatischer Anziehungskräfte kann damit als gesichert gelten. Sie wird durch die Bevorzugung der doppelt negativ geladenen Phospholipide CL und PA, weiterhin durch den beobachteten Einfluß von pH-Wert und Ionenstärke und schließlich auch durch die Wirkung einer chemischen Modifikation des AAC-Proteins belegt; die hier gewählten Modifizierungsreaktionen führten zu einem Verlust der positiven Ladung basischer Aminosäure-Seitenketten, die als Bindungsstellen für negativ geladene Lipide in Frage kommen

(s. Abschnitt 5.3.).

Daneben müssen aber noch andere Wechselwirkungen eine Rolle spielen. So lassen sich die unterschiedlichen relativen Bindungskonstanten wie auch die unterschiedliche Kompetitionsfähigkeit von CL und PA nicht aus deren Nettoladung ableiten. Ein Grund könnte die Verteilung der Ladungen sein, die beim Cardiolipin eine weitergehende gleichzeitige Annäherung an zwei Aminosäurereste gestattet. Tatsächlich enthält die Sequenz des AAC-Proteins am carboxy-terminalen Teil an vier Stellen unmittelbar aufeinanderfolgende basische Aminosäuren. Ähnlich könnte selbst das zwitterionische PC mit der Oberfläche von Proteinen in Wechselwirkung treten, wie es im Fall der β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase vorgeschlagen worden ist (Grover et al., 1975).

Allerdings zeigt ein Verdrängungsversuch, daß auch Dilyso-Cardiolipin eine geringere Affinität zum AAC als CL aufweist. Hier bieten hydrophobe Interaktionen der Fettsäureketten eine naheliegende Erklärung. Demgegenüber fanden Powell et al. (1987) an Cytochrom c-Oxidase keinen Affinitätsunterschied zwischen Cardiolipin und Monolyso-Cardiolipin; das Dilyso-Derivat war nicht untersucht worden, weil sich daran mit den üblichen Methoden keine Spinmarkierung anbringen läßt. Diese Autoren kommen zu dem Schluß, daß neben direkten elektrostatischen Kräften spezifische Kopfgruppen- und möglicherweise Hydratationseffekte zur Lipid-Selektivität dieses Proteins beitragen, während hydrophobe Wechselwirkungen eine untergeordnete Rolle spielen. Letzteres trifft anscheinend für das AAC-Protein weniger zu. Dies mag allerdings auch an der in beiden Untersuchungen unterschiedlichen Umgebung der Proteine liegen. In einer Phospholipidmembran ist der gesamte hydrophobe Teil der Proteinoberfläche stets von gleichartigen Kohlenwasserstoffketten umgeben. Im Fall eines Detergens-solubilisierten Membranproteins spielt der hydrophobe Effekt ebenfalls eine wichtige Rolle, doch unterscheiden sich die hydrophoben Teile verschiedener Detergentien sowohl untereinander als auch von denen der Glycerophosphatide. Daher kann in dieser Umgebung u.U. ein bestimmtes Phospholipid auch deshalb eine erhöhte Affinität zu einem integralen Membranprotein aufweisen, weil es mehr Fettsäureketten enthält als seine "Konkurrenten". Es ist also gut vorstellbar, daß in Detergensmizellen hydrophobe Interaktionen zwischen Fettsäureketten und einem Membranprotein mehr zu dessen Lipid-Selekti-

vität beitragen als in einer Phospholipidmembran.

Ein weiteres Indiz dafür, daß elektrostatische Kräfte allein nicht zur Erklärung der dargestellten Bindungs- und Aggregationseffekte ausreichen, ist die Tatsache, daß α -Glycerophosphat, die Kopfgruppe der Phosphatidsäure, weder 12-PASL wirksam verdrängen noch die Aggregation des AAC-Proteins auslösen kann. Bei den entsprechenden Versuchen wurde wegen der Wasserlöslichkeit von α -Glycerophosphat eine gegenüber dem Phospholipid um 2 Größenordnungen höhere Konzentration eingesetzt. Obwohl auch das wasserlösliche Analogon sicher mit positiv geladenen Aminosäureresten des AAC elektrostatisch wechselwirkt, ist seine Verweildauer am Protein offenbar so kurz, daß es nicht zur Aggregation kommt. Die Ergebnisse eines Kompetitionsversuches weisen in dieselbe Richtung: α -Glycerophosphat konnte selbst in 100-fachem Überschuß weniger 12-PASL verdrängen als eine äquimolare Menge Phosphatidsäure. Daher sind an der hier beschriebenen Phospholipidbindung sicher auch hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt.

Dagegen beobachteten Pember et al. (1983) eine Hemmung der Cardiolipinbindung von Cytochrom P-450 durch α -Glycerophosphat, während sich Glyzerin und Kaliumphosphat als wirkungslos erwiesen. Hier ist offenbar der spezifische Bau der Kopfgruppe ausschlaggebend, wobei an eine Bindung im klassischen Sinne eines Enzym-Substrat-Komplexes gedacht werden kann. Hingegen zeigt die Selektivitätsreihe dieses Proteins keine Übereinstimmung mit der Ladung der untersuchten Phospholipide. Eine Übersicht über die bei den drei genannten Proteinen dominierenden Protein-Lipid-Wechselwirkungen gibt Tabelle 15.

Es ist plausibel, daß sowohl das betreffende Membranprotein selbst als auch seine Umgebung darüber mitentscheiden, welche Kräfte jeweils in den Vordergrund treten. Eine Verallgemeinerung von Einzelbeobachtungen ist daher nur unter großen Vorbehalten möglich.

Tabelle 15. Die bei drei integralen Membranproteinen vorgeschlagenen Ursachen für selektive Lipidbindung

Protein	Umgebung	Elektrostatische Anziehung	"Kopfgruppen-spezifische" WW	Hydrophobe WW
AAC	Triton X-100	+	-	+
Cytochrom Oxidase ¹	PC	+	+	-
Cytochrom P-450 ²	Tween 80	-	+	-

¹ nach Powell et al. (1987)

² nach Pember et al. (1983)

In diesem Zusammenhang soll noch auf eine praktische Anwendung derartiger Lipid-Protein-Interaktionen hingewiesen werden. Die Wechselwirkung mitochondrialer Transportproteine mit Cardiolipin kann auch zu ihrer Reinigung ausgenutzt werden. Die Ausbeute an Phosphatranslokator ließ sich erheblich steigern, indem vor der Hydroxylapatit-Chromatographie CL zugesetzt wurde (Kadenbach et al., 1982). Kürzlich gelang es Krämer et al. (1986), durch Ausbau dieser Strategie den Aspartat/Glutamat-Translokator zu reinigen, wobei die Hauptschwierigkeit in der Abtrennung des AAC-Proteins bestand. Sie konnte schließlich durch Anwendung von CL in Kombination mit mehrfachem Pufferwechsel überwunden werden. Cardiolipin beeinflusst nämlich die Elutionsgeschwindigkeit beider Proteine in einer Hydroxylapatitsäule, jedoch in Abhängigkeit vom Puffer in entgegengesetzter Weise. Zwar wurde eine Erklärung dafür bisher nicht gefunden, doch erleichterte dieser Effekt die subtile chromatographische Trennung wesentlich.

Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit von Phospholipid- und Inhibitorbindung am AAC-Protein (s. Abschnitt 4.5.) fiel auf, daß sowohl spinmarkierte Phosphatidsäure als auch der spinmarkierte Inhibitor CATSI bis $\text{pH} = 10$ gebunden blieben, während bei weiterer Steigerung um eine pH-Einheit eine beinahe vollständige Freisetzung beider Moleküle eintrat. In stark saurer Lösung ($\text{pH} < 5$) blieben diese zwar auch nicht gebunden; ihr Abdissoziieren erfolgte aber anscheinend kontinuierlich über einen Bereich von mindestens zwei pH-Einheiten. Man kann diesen Unterschied damit erklären, daß in alkalischen Medium die positiven Ladungen der jeweiligen spezifischen Bindungsstellen ausbalanciert werden und dadurch die Bindung aufgehoben wird. In stark saurer Lösung denaturiert das Protein zwar, doch werden die Bindungsstellen für negativ geladene Liganden zunächst nur indirekt über stufenweise Konformationsänderungen des gesamten Polypeptids berührt. Daher lassen sich hier keine scharfen Umschlagpunkte beobachten.

5.3. Zur Lokalisierung der Bindungsstellen für Cardiolipin in der Sequenz des AAC

Der im alkalischen Bereich beobachtete "Äquivalenzpunkt" entspricht etwa dem pK_s -Wert der ϵ -Aminogruppe von freiem Lysin, wie schon im Ergebnisteil ausgeführt wurde. Allerdings liegen die pK_s -Werte basischer Seitenketten in Proteinen in der Regel niedriger als in den entsprechenden freien Aminosäuren; manchmal kann dieser Unterschied sehr groß sein [vgl. Glaser, 1976] besonders wenn die betreffende Aminosäure Teil eines aktiven Enzymzentrums ist. Einen Extremfall stellt das Lysin im aktiven Zentrum der Acetoacetat-Decarboxylase dar, dessen pK_s gegenüber dem Erwartungswert um über vier Einheiten herabgesetzt ist [Schmidt & Westheimer, 1971]. Folglich können allein aufgrund der pH-Abhängigkeit der Phospholipidbindung des AAC Argininreste (der pK_s -Wert von freiem Arginin wird mit 12,5 angegeben) als Bindungsstellen nicht ausgeschlossen werden.

Daher wurden Versuche zur chemischen Modifizierung von Lysin und Arginin durchgeführt. Dazu wurden Reaktionen gewählt, die bei möglichst hoher Spezifität für eine der beiden genannten Aminosäuren zur Aufhebung bzw. Umkehrung der Ladungen dieser Aminosäuren führen. Das Trimethyllysin in Position 91 der Sequenz des AAC konnte allerdings nicht modifiziert werden.

Sowohl die Blockierung der Lysin- als auch der Argininreste führte zu einer Herabsetzung der Bindung von spinmarkierten Analoga von Cardiolipin und Phosphatidylsäure. Diese Effekte waren im Rahmen der Auswertegenauigkeit additiv; das stimmt mit der Erwartung überein, daß die beiden Reagentien Pyridoxalphosphat und 2,3-Bisindolyl selektiv mit Lys bzw. Arg reagieren. Darüber hinaus ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, daß sich sowohl Lysin- als auch Argininreste an der Bindung saurer Phospholipide beteiligen. Welche Positionen der Primärstruktur des AAC kommen nun als Bindungsstellen in Frage?

Nach ausgiebiger Behandlung mit hohen Überschüssen beider Modifizierungsreagentien war ESR spektroskopisch keine Cardiolipinbindung mehr nachweisbar (s. Abb. 16). Also waren die Bindungsstellen von der wässrigen Phase aus zugänglich. Das paßt zu der Annahme, daß solche Bindungsstellen eines Membranproteins sich an der Grenzfläche von Phospholipidmembran bzw. Betrugsmizelle zur wässrigen Phase befinden, sofern die polaren Kopfgruppen unmittelbar mit der Proteinoberfläche wechselwirken. Dies kann aus den in den Abschnitten 4.4. und 4.5. geschilderten Ergebnissen mit hoher Wahrscheinlichkeit gefolgert werden.

Die Lage der Lysine des AAC-Proteins ist von Bogner et al. (1966) mittels chemischer Modifikation und nachfolgender Sequenzierung bereits eingehend untersucht worden. Die Reaktivität der einzelnen Positionen war je nach Konformation des Proteins und Art der Umgebung unterschiedlich. Hier interessieren vor allem die Verhältnisse am solubilisierten CAT AAC Komplex. Von den 12 insgesamt zugänglichen Lysinen zeigten die in Position 42, 62, 106, 146 und 262 einen besonders hohen Einfluß von Pyridoxalphosphat. Davon war das Lysin in Pos. 106 auch an CAT-

beladenen Mitochondrien zugänglich. Also besteht für diese Position offenbar kein Schutz durch gebundenes CL gegen den Angriff von PLP, wie er für die anderen genannten Lysinreste beobachtet wurde. Dieses Lysin ist somit wahrscheinlich nicht an der Phospholipidbindung beteiligt. Nach einem Modell der Faltung des AAC in der Mitochondrienmembran (Bogner et al., 1986) liegen die Lysine in Pos. 48, 62 und 146 in der Lipid-Kopfgruppenregion der Matrix-Seite, das an Pos. 20 befindliche Lysin an entsprechender Stelle der cytosolischen Seite. Da die Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran etwa dreimal soviel Cardiolipin enthält wie die Cytosolseite (Krebs et al., 1979), werden Bindungsstellen für dieses Phospholipid eher dort zu erwarten sein. Das ist aber beim derzeitigen Kenntnisstand nur eine Spekulation.

Zur Neutralisierung der Ladungen eines Cardiolipinmoleküls sind zwei basische Aminosäurereste nötig. Die Annahme, daß ein Phospholipidmolekül an zwei geladene Aminosäuren gleichzeitig bindet, führt zu einer Verringerung der Zahl der potentiellen Bindungsstellen. Außerdem läßt sich eine Beteiligung sowohl von Lys als auch von Arg bei nur zwei spezifischen Bindungsstellen pro Proteindimer unter dieser Annahme eher plausibel machen. Andernfalls würde man aus dem Aufbau des Proteins aus zwei identischen Untereinheiten folgern, daß für beide Cardiolipin-Bindungsstellen die gleiche Aminosäure (Lys oder Arg) verantwortlich ist. Das widerspricht aber den hier vorgelegten Ergebnissen der chemischen Modifizierungsversuche (Abschnitt 4.9.).

Folgt man dieser Argumentation, so stellt sich wiederum die Frage nach der Lokalisierung der Lipid-Bindungsstellen in der Sequenz. Die entsprechenden Aminosäuren können entweder unmittelbar aufeinanderfolgen oder durch die Ausbildung der Tertiärstruktur einander benachbart sein, oder sogar auf verschiedenen monomeren Einheiten des AAC liegen; diese letzte Möglichkeit wird unten im Zusammenhang mit dem Aggregationsphänomen diskutiert.

Die Primärstruktur des AAC-Proteins (Aquila et al., 1982) enthält in Pos. 234-236 dreimal Arginin, in Pos. 294/295 zweimal Lysin und in Pos. 243/244 sowie 258/259 die Sequenz Arg-Lys. Die letztgenannten Stellen erfüllen somit die Bedingung einer gleichzeitigen Beteiligung von Lysin und Arginin. Allerdings waren ihre Lysinreste für PLP kaum zugänglich und liegen nach aktuellen Modellvorstellungen auch nicht auf der Matrixseite der Membran (Bogner et al., 1986). Über den zweiten denkbaren Fall, daß in der Sequenz getrennte basische Aminosäuren durch die Faltung des AAC einander nahekommen könnten, kann bei der großen Zahl solcher Aminosäuren zur Zeit nur spekuliert werden. Wahrscheinlich sind die in α -Helices liegenden Positionen als Bindungsstellen für Lipid-Kopfgruppen auszuschließen, da diese Strukturelemente im Innern der Phospholipidmembran eingebettet sein dürften. Typische α -Helices bestehen ohnehin überwiegend aus unpolaren Aminosäuren.

In Betracht kommen am ehesten die Kombinationen von Arg (59) mit Lys (48) oder (62) und von Lys (146) mit Arg (151), die nach dem Modell von Bogner et al. (1986) auf nichthelikalen Abschnitten der Matrixseite liegen.

Eine für die Zukunft vielversprechende Methode zur Klärung solcher Fragen wurde von McMillen et al (1986) entwickelt. Sie synthetisierten Phospholipide, an deren Kopfgruppe sich eine Aldehydfunktion befindet, die bei Kontakt mit Aminogruppen zur Schiff'schen Base reagiert. Zusätzlich wurden noch radioaktive oder Spin-Markierungen angebracht, um den Verbleib der Sonde feststellen zu können. Auf diese Weise wurde eine Zuordnung der Lipid-Bindungsstellen von Cytochrom c-Oxidase zu bestimmten Untereinheiten dieses Proteins ermöglicht, während die Sequenzierung der modifizierten Polypeptide bisher nicht versucht wurde. Ein Mangel der in dieser Arbeit vorgestellten substituierten Phospholipide liegt im Verlust einer negativen Ladung durch die Anbringung der reaktiven Gruppe. Daher muß mit einer Veränderung der Eigenschaften dieser Moleküle auch bezüglich des Bindungsverhaltens gerechnet werden. Neuerdings wurde ein Benzaldehyd-Derivat des Cardiolipins synthetisiert, das noch die beiden negativen Ladungen der Stammverbindung besitzt, da die Substitution am zentralen Glycerin des CL erfolgte (Kuppe et al., 1987).

Einen anderen Weg gingen in einer kürzlich erschienenen Arbeit Cheneval & Carafoli (1988). Sie spalteten das periphere Membranprotein Kreatin-Kinase mit CNBr und trennten die Bruchstücke chromatographisch. Nach Vorbehandlung des Fragmentgemisches mit Liposomen aus Cardiolipin fehlte das N-terminale Fragment auf dem Chromatogramm. Daher lokalisierten diese Autoren die Bindungsstelle für Cardiolipin (vgl. Müller et al., 1985) auf dem N-Terminus der Kreatin-Kinase. Auch bei diesem Protein führt chemische Modifizierung von Lys und Arg zu einer starken Abnahme der Cardiolipinbindung, während His, Met und Cys für diese unbedeutend zu sein scheinen.

Die von Cheneval & Carafoli angeführten Sequenzhomologien zwischen der extrinsischen Kreatin-Kinase und Cardiolipin-bindenden integralen Membranproteinen können allerdings kaum überzeugen. Im Fall der Cytochrom c-Oxidase decken sie sich auch nicht mit den Ergebnissen von McMillen et al. (1986), die die Phospholipid-bindende Region vorwiegend auf der Untereinheit VII lokalisierten; Sequenzhomologien mit Kreatin-Kinase wurden nur für die Untereinheiten I und V gefunden. Der Sequenzvergleich des aminoterminalen Teils der Kreatin-Kinase mit dem carboxyterminalen Ende des AAC ergibt in sechs Positionen Übereinstimmung. (Cheneval & Carafoli finden nur fünf, da sie die Sequenz des AAC an drei Stellen unrichtig wiedergeben.) Darunter befinden sich an basischen Aminosäuren nur Lys (267), welches für PLP im CAT-AAC-Komplex nicht zugänglich ist (Bogner et al., 1986), sowie Arg (279). Überhaupt sind die Übereinstimmungen der Primärstrukturen des AAC-Proteins mit der des Phosphat-Translokators und der des Entkoppler-Proteins aus braunem Fettgewebe größer als die mit der Sequenz der Kreatin-Kinase (vgl. Aquila et al., 1987). Der Phosphattranslokator zeigt aber im Vergleich mit Kreatin-Kinase nur in einer einzigen Position Übereinstimmung (Cheneval & Carafoli, 1988).¹

¹Die von Beyer & Klingenberg (1985) veröffentlichten Ergebnisse über den AAC sind von Cheneval & Carafoli offenbar mißverstanden worden: Nicht die Bindung von Cardiolipin an den AAC erfordert denaturierende Bedingungen, sondern die Entfernung des mitisolierten mitochondrialen CL.

5.4. Lipidinduzierte Aggregation des AAC-Proteins

Eine in dieser Arbeit untersuchte Eigenschaft des solubilisierten AAC-Proteins ist seine Neigung, ohne Denaturierung zu aggregieren und zu präzipitieren. Allerdings muß das Detergens/Protein-Verhältnis vorher auf ca. 300 mol/mol herabgesetzt werden; dieser Wert liegt aber immer noch weit über der vom Protein gebundenen Triton-Menge (Hackenberg, 1979). Unter diesen Umständen führte bereits ein geringer (< 2-facher) molarer Überschuß an Cardiolipin zur Präzipitation des Proteins.

Die mittels Spinmarkierung von Phospholipid (Abb. 17) und protein-gebundenem Inhibitor (Abb. 19) festgestellten Aggregationsmaxima decken sich allerdings nicht. Der Prozentsatz des sedimentierten Cardiolipins erreicht seinen Höchstwert bei einem etwa doppelten molaren Überschuß über das dimere AAC-Protein; der Anteil des präzipitierten Proteins ist dagegen erst bei 5-8-fachem CL-Überschuß maximal. Diese Diskrepanz ist leicht erklärbar, wenn man berücksichtigt, daß das im Überstand befindliche Lipid bei höherem CL-Überschuß längst nicht vollständig mit dem Protein assoziiert ist; der spezifische Inhibitor CATSL blieb dagegen in allen Proben proteingebunden. Die Dissoziationskonstanten von CLSL und CATSL unterscheiden sich um mehrere Größenordnungen (s. Abschnitt 5.1.). Nur Abb. 19 gibt die Präzipitation des Proteins korrekt wieder. Die Übereinstimmung des Aggregationsmaximums in Abb. 17 bei einem Lipid/Protein-Verhältnis von 2,15 mit der vorher bestimmten Zahl von 2 Bindungsstellen dürfte zufällig sein, da diese Bindungsstellen erst bei größerem Lipidüberschuß einigermaßen vollständig besetzt werden.

Die einfachste Erklärung für die lipidinduzierte Proteinaggregation wäre eine Neutralisierung der 18 vorhandenen positiven Überschußladungen des monomeren AAC durch negative Lipide. Ein Teil dieser Ladungen könnte bereits durch "endogenes" (d.h. mitisoliertes) Cardiolipin aufgehoben sein (s. Abschnitt 5.5.), so daß evtl. zwei Moleküle zugegebenes Cardiolipin zu einer völligen Neutralisierung der Proteinoberfläche ausreichen. Um damit einen Aggregationseffekt zu erklären, muß man annehmen, daß die proteinhaltigen Mizellen durch elektrostatische Abstoßung an der Fusion gehindert werden. Nach Ausschaltung dieser Kraft

käme es demnach zur Präzipitation des AAC-Proteins unter Freisetzung von Detergens in Form reiner Mizellen (der Detergensgehalt der Präzipitate ist mit ca. 20-70 mol/mol Protein wesentlich geringer als die zur Bildung einer gemischten Mizelle erforderlichen 165 Moleküle Triton/AAC-Dimer). Wird so viel saures Lipid zugegeben, daß eine negative Nettoladung der proteinhaltigen Mizellen resultiert, ist die abstoßende Kraft wieder vorhanden.

Es ist nicht ganz korrekt, in diesem Zusammenhang von "Wiederauflösung" der Aggregate zu sprechen, da die gesamte Cardiolipinmenge in den beschriebenen Versuchen auf einmal zugegeben wurde. Ob es tatsächlich zu einer solchen Auflösung bereits gebildeter Niederschläge durch weiteres CL käme, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und hängt von der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung im nunmehr dreiphasigen System (Wasser-Mizelle-Präzipitat) ab.

In ganz anderem Zusammenhang ist die Bildung von Präzipitaten durch Wechselwirkung von Poly-Lysin mit Liposomen von CL, PS und PG, nicht dagegen mit solchen von PC und PE beobachtet worden (De Kruijff & Culis, 1980). Hier kann es sich nur um elektrostatische Kräfte handeln.

Gegen diese einfache Erklärungs der Lipid-induzierten Aggregation des AAC spricht die Beobachtung, daß sie nur von CL und PA ausgelöst werden konnte. Die einfach negativ geladenen Lipide PG und SA ergeben diesen Effekt auch bei hohem Überschuß nicht. Man könnte daher vermuten, daß ein Cardiolipinmolekül an zwei Proteinmoleküle gleichzeitig "bindet" und auf diese Weise eine Vernetzung der proteinhaltigen Detergensmizellen herbeigeführt wird. Anschließend würde auch nach dieser Vorstellung das Detergens in Form freier Mizellen abgeschieden; dieser Vorgang kann anscheinend mehrere Stunden beanspruchen. Allerdings scheint die Annahme einer solchen Vernetzung zunächst der oben dargelegten Interpretation der chemischen Modifizierungsversuche zu widersprechen, nach denen sowohl Arg als auch Lys an der Cardiolipinbindung beteiligt sind. Bei Bindung an beide Aminosäuren in einem Proteinmolekül wäre ein Molekül CL außerstande, zusätzlich an ein weiteres AAC-Molekül anzukoppeln. Es wurde aber bereits in Abschnitt 5.3. angedeutet, daß auf der Basis der dimeren Proteinstruktur eine

weitere Möglichkeit für die Lokalisierung der gebundenen Lipidmoleküle vorstellbar ist. Die Bindungsstellen für CL könnten nämlich zwischen den identischen Monomeren des Proteins liegen und das Lipid somit zu deren Zusammenhalt beitragen. Dieser ist sicher nicht durch kovalente Bindungen bedingt, da durch SDS ein Zerfall in die Monomeren hervorgerufen wird. Bei hoher Protein- und niedriger Detergenskonzentration könnte nun eine dieser Bindungen eines CL-Moleküls gelöst und stattdessen ein anderes Proteinmolekül in diese Wechselwirkung einbezogen werden, ohne daß diese deswegen einen grundsätzlich anderen Charakter annehmen müßte. Auf diese Weise könnten auch größere Aggregate entstehen.

Vielleicht hat dieser Aspekt auch biologische Bedeutung, denn andere mitochondriale Transportproteine wie der Phosphattranslokator (Aquila et al., 1987) liegen ebenfalls in dimerer Form vor. Andere integrale Membranproteine sind Oligomere. Dies trifft u.a. für Cytochrom c-Oxidase zu, ein Protein, dessen Selektivität zugunsten von Cardiolipin bereits gründlich untersucht worden ist (s. Abschnitt 5.1.). In solubilisierter Form aggregiert es ebenfalls nach Zusatz von Cardiolipin, wie durch Gelelektrophorese gezeigt werden konnte (Powell & Abramovitch, 1986). Dabei ist die Art des verwendeten Detergens von Bedeutung: Nur in Desoxycholat und Triton X-100 löste CL starke Aggregation aus, während es in anderen Detergentien wie Octylglukosid keinen Effekt zeigte. Die Autoren diskutieren kurz mögliche Beziehungen zwischen der bekannten Aktivierung des Enzyms durch Cardiolipin und diesen Einflüssen von Lipid und Detergens auf seine Quartärstruktur.

Eine Stabilisierung von Protein-Oligomeren in der Biomembran durch Lipid-Protein-Wechselwirkungen erscheint durchaus denkbar, wenn auch Protein-Protein-Wechselwirkungen wie etwa Salzbrücken sicher ebenfalls einen Beitrag zu der Ausbildung solcher Quartärstrukturen leisten. Der Adeninnukleotid-Translokator besitzt als Dimer nur eine Substratbindungsstelle, so daß eine monomere Untereinheit funktionsunfähig sein sollte. Auch dies dürfte sich auf andere, z.T. durch Sequenz-Homologien "verwandte" Transportproteine übertragen lassen.

Möglicherweise werden auch die Wechselwirkungen verschiedener Membranproteine untereinander durch Phospholipide vermittelt. Hier sei nochmals auf die Arbeit von Cheneval & Carafoli (1988) verwiesen. Darin wird ein möglicher Zusammenhang zwischen der aufgrund der Funktion postulierten Nachbarschaft von Kreatin-Kinase und ADP/ATP-Translokase und der Cardiolipinbindung der beiden Proteine diskutiert. Ein unvermittelter Kontakt zwischen den beiden Proteinen ist u.a. deshalb unwahrscheinlich, weil der isoelektrische Punkt in beiden Fällen im basischen Bereich liegt (Müller et al., 1985).

Die Struktur der hier beschriebenen Aggregate des AAC-Proteins ist im wesentlichen noch unbekannt. Jedoch handelt es sich wohl kaum um eine Phospholipid-Doppelschicht mit darin eingebetteten Proteinmolekülen. Die zugegebene Menge von 5-8 mol Cardiolipin/mol AAC-Dimer am Präzipitationsmaximum reicht nicht einmal zum Aufbau einer "boundary layer" aus. Ein ^{31}P -NMR-Spektrum eines derartigen Präzipitates zeigte, daß das darin enthaltene Phospholipid sich überwiegend isotrop bewegt, mithin keine eigentliche Doppelschicht-Struktur ausbildet (K. Beyer, persönliche Mitteilung). Auch die weiter unten diskutierten Saturation Transfer-Untersuchungen, die kaum Unterschiede zwischen lipidinduzierten und durch Detergensenzug dargestellten Aggregaten ergaben, sprechen gegen eine Membranstruktur.

Auch der Detergensgehalt im Niederschlag ist offenbar relativ gering. Dagegen wird eine beträchtliche, je nach den Versuchsbedingungen unterschiedliche Menge Wasser gebunden, so daß das Volumen nach Lyophilisation erheblich zusammenschrumpft. Am wasserreichsten scheinen die allein durch Detergensenzug gebildeten Präzipitate zu sein, während die CL-haltigen offenbar kompakter sind. Die Zusammensetzung der Präzipitate sollte in Zukunft eingehender mit analytischen Methoden untersucht werden; dabei wird besonders auf die Abhängigkeit der gebundenen Detergens- und Wassermenge vom zugesetzten Cardiolipin zu achten sein.

5.5. "Internes" und "externes" Cardiolipin

Eine Unsicherheit besteht bezüglich des wirklichen Lipid/Protein-Verhältnisses. In den Abb. 17 und 19 wurde nur das zugegebene Cardiolipin berücksichtigt. Es ist aber bekannt, daß der in der beschriebenen Weise (Klingenberg et al., 1979) isolierte AAC größere Mengen mitochondriales Cardiolipin enthält. Der angegebene Wert von 6 mol/mol AAC-Dimer (Beyer & Klingenberg, 1985) stellt möglicherweise nur einen Mittelwert dar, da der Phosphatgehalt der proteinhaltigen Fraktionen nach der abschließenden Sephadex G-75 Chromatographie unterschiedlich ist. Das Phosphat/Protein-Verhältnis lag in einem Fall in der Vorfraktion bei 4 ($\approx$ 2 mol CL/mol AAC) und stieg kontinuierlich an.

Dieses mitisolierte Cardiolipin kann durchaus zur Neutralisierung der positiven Überschußladungen des AAC und damit zu dessen Aggregation beitragen. Dafür spricht die Beobachtung, daß sich die im gelchromatographischen Reinigungsschritt anfallenden frühen Fraktionen nach Verringerung der Detergenskonzentration auf etwa 200-250 mol Triton/mol Protein bereits trübten; in einer späteren Fraktion setzte die Proteinaggregation sogar schon bei >300 mol Triton/mol Protein ein. Die Tritonbindung des AAC beträgt aber nur 165 mol/mol (Hackenberg & Klingenberg, 1980); daher sollte eine Abreicherung bis zu diesem Wert ohne Ausfällung des Proteins möglich sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden bevorzugt frühe Fraktionen verwendet, die außerdem den Vorteil eines geringeren Detergensgehaltes besitzen. Da auch diese nicht völlig frei von mitochondrialem Phospholipid sind, stellt sich die Frage, ob dieses mit dem nachträglich zugegebenen, spinmarkierten Lipid im Gleichgewicht steht. Dies erscheint unwahrscheinlich angesichts der Tatsache, daß extern zugegebener CLSL zu etwa 80% gebunden wird, wenn das CLSL/Protein-Verhältnis etwa 0,5 beträgt (s. Ergebnisteil). Bei Äquilibrierung mit internem Cardiolipin, das die gleichen Bindungsplätze bereits besetzt hat, würde man eine weit geringere Bindung von 12-CLSL erwarten. Da die mittels NMR-Messungen angegebene Cardiolipinbindung 6 mol/mol AAC beträgt (Beyer & Klingenberg, 1985) und selbst frühe Fraktionen 4 mol Phosphat/mol AAC enthalten (s.o.), liegt unter diesen Bedingungen das "interne" gegenüber dem "externen" Cardiolipin in 12- bzw. 4-fachem Überschuß vor. Nach Zugabe von 0,5 mol 12-CLSL/mol Protein sollte der immobilisierte Anteil

der Spinsonde bei Konkurrenz um dieselben Bindungsstellen unter 8% bzw. bei 20% liegen. Daß das spinmarkierte Analogon aufgrund seiner Nitroxylgruppe an Stellen der Proteinoberfläche bindet, die für unmarkiertes Cardiolipin keine Affinität aufweisen, wird durch die Verdrängungsversuche widerlegt. Hier erfolgte - zumindest teilweise - eine rasche Äquilibrierung zwischen spinmarkiertem und unmarkiertem "externem" Phospholipid.

Nicht völlig ausschließen kann man die Möglichkeit, daß ein Teil des internen Cardiolipins während der Reinigungsprozedur zumindest den Vorfraktionen verlorenght und die dadurch freigewordenen Bindungsplätze von spinmarkiertem CL besetzt werden. Dagegen spricht allerdings die unterschiedliche Empfindlichkeit der Proteinbindung von "internem" CL und CLSL gegenüber überschüssigem Detergens. Nur CLSL kann durch Triton X-100 von der Proteinoberfläche verdrängt werden (s. Tabelle 6). Das "interne" CL bleibt auch nach Dichtegradienten-Zentrifugation proteingebunden und konnte bisher nur unter denaturierenden Bedingungen wie hoher SDS-Konzentration und gleichzeitiger Hitzebehandlung freigesetzt werden (Beyer & Klingenberg, 1985). Es ist also wahrscheinlich, daß "internes" und "externes" Cardiolipin verschiedene Bindungsplätze am AAC-Protein besetzen, wobei die Bindung des "internen" CL fester sein dürfte.

Bei rein thermischer Denaturierung des AAC-Proteins (ohne SDS) wird nur ein verhältnismäßig geringer Teil des gebundenen 12-CLSL freigesetzt (vgl. Fußnote in Abschnitt 4.6.1.). Ob bei hohen SDS-Konzentrationen eine Freisetzung des gebundenen spinmarkierten Phospholipids erfolgt, konnte ESR-spektroskopisch nicht entschieden werden (s. Abschnitt 4.8.2.), da SDS auch in Abwesenheit von Protein die Linienbreite spinmarkierter Lipide verringert (vgl. Abb. 15). Offenbar verändert SDS die Struktur der Triton-Mizellen derart, daß die Mobilität der darin befindlichen Phospholipide zunimmt. Möglicherweise steigt auch die Austauschrate zwischen proteingebundenem und freiem Lipid. Dafür sprechen die mit der SDS-Konzentration zunehmenden Schwierigkeiten bei der spektralen Subtraktion zur Bestimmung der gebundenen Lipidkomponente. Die SDS-Versuche eignen sich daher nicht zur Differenzierung zwischen der im NMR- und im ESR-Spektrum beobachtbaren Cardiolipinbindung des AAC-Proteins.

5.6. Zur Beweglichkeit des mitochondrialen Adennukleotid- Translokators

Die Mobilität des AAC-Proteins ist bereits mehrfach untersucht worden. Dabei wurden sowohl optische Methoden (Müller et al., 1983; Finckh, 1987) als auch die ST-ESR-Spektroskopie (Horvath et al., 1988) eingesetzt. Die vorliegende Arbeit lieferte ergänzende Daten zu diesen teilweise widersprüchlichen Literaturangaben. Der Schwerpunkt liegt hier auf der Untersuchung von Lipid-induzierten oder durch Detergensentzug erzeugten Proteinaggregaten.

Obwohl dieses System die natürlichen Verhältnissen nur unvollkommen wiedergibt, wurde es mit Hilfe der ST-ESR-Spektroskopie näher charakterisiert. Hierfür waren die zu vermutenden Protein-Protein-Wechselwirkungen ausschlaggebend, da vergleichbare Interaktionen auch in der inneren Mitochondrienmembran eine Rolle spielen dürften. Eine Denaturierung des AAC-Proteins während der Fällung konnte nach dem Kriterium der spezifischen Inhibitorbindung ausgeschlossen werden (s. Abschnitt 4.8.). Gegenüber der natürlichen Phospholipidmembran bietet das Aggregat eines speziellen Membranprotein den ESR-meßtechnischen Vorteil einer hohen Spinkonzentration bei gleichzeitig spezifischer Markierung (vgl. Abb. 23). Für die Untersuchung von Mitochondrien war eine zehnmal so große Geräteverstärkung nötig wie für das Präzipitat, was mit der Angabe korreliert, daß der AAC etwa 10% des mitochondrialen Membranproteins ausmacht. Demnach wäre die Proteinkonzentration in beiden Präparaten vergleichbar.

Zunächst ist die Frage zu behandeln, ob die mit verschiedenen Methoden erhaltenen Daten überhaupt die Beweglichkeit des AAC-Proteins allein charakterisieren. Vor allem bei Versuchen an Mitochondrien kann davon nicht ohne weiteres ausgegangen werden, sondern die Spezifität der Markierung ist in jedem Einzelfall nachzuweisen. Die von Müller et al. (1983) mit Hilfe von Eosin-Maleimid nach Vorbehandlung mit N-Ethyl-Maleimid (NEM) gemessene blitzinduzierte Absorptions-Anisotropie scheint dieses Kriterium nicht zu erfüllen, da NEM die Reaktion des Fluorophors mit anderen mitochondrialen Membranproteinen nicht vollständig verhindert. Unter allen Umständen werden etwa 20 - 50% des Eosin-Maleimids in andere Proteine eingebaut (Finckh, 1987). Vermutlich geben die Daten von Müller et al. daher nur eine mittlere Beweglichkeit

aller dieser Proteine an, von denen der AAC etwa 9-10% ausmacht. Durch Einsatz von Derivaten der bekannten spezifischen Inhibitoren des AAC-Proteins, die unter Erhalt der Bindungsspezifität mit Phosphoreszenz- oder Spinsonden gekoppelt wurden, kann aber die abschließliche Markierung dieses Proteins erreicht werden.

Das nächste Problem besteht in einer möglicherweise vorhandenen Heterogenität der Präparationen. Sowohl die Proteinpräparation selbst als auch der Einbau der Markierungen kann uneinheitlich sein. Eine solche Heterogenität kann anhand von ST-ESR-Spektren in der Regel nicht erkannt werden, da nur sehr mobile Spinsonden ($\tau_r \leq 10^{-7}$ s) aufgelöste Eigensignale liefern. Diese entsprächen im Fall des spinmarkierten Inhibitors CATSL den in der wässrigen Phase befindlichen, nicht gebundenen Molekülen, die aus den hier untersuchten Präzipitaten durch einen Waschschrift entfernt werden könnten.

Einen Hinweis auf eine Heterogenität im Grad der Immobilisierung der CATSL-Moleküle geben ihre konventionellen (V_1 -) ESR-Spektren (s. Munding et al., 1983). Es handelt sich dabei um Zweikomponentenspektren, die aus einem "s"- und aus einem "w"-Anteil bestehen. Über deren Natur besteht noch keine Klarheit. Die nächstliegende Erklärung der "w"-Komponente wäre eine Zuordnung zu in der Membran bzw. Detergensemizelle befindlichen Molekülen der Spinsonde. Dafür spricht die Tatsache, daß Subtraktionen entsprechender Spektren von den Zweikomponentenspektren zu immobilisierten Einkomponentenspektren führen (Horvath et al., 1988).

Demgegenüber enthält die Arbeit von Munding et al. (1983) Hinweise darauf, daß ein Teil der spektralen "w"-Komponente auf proteingebundenen CATSL zurückzuführen ist. Hier sei nur die Empfindlichkeit beider spektraler Komponenten gegenüber unmarkiertem CAT erwähnt. Drei mögliche Fälle werden in dieser Arbeit diskutiert. Nach einer dieser Vorstellungen ist die Zusammensetzung dieser Spektren aus zwei Komponenten nur scheinbar und kommt durch überlagerte Bewegung der gebundenen Spinsonde und des Proteinmoleküls zustande, die zu einer sehr starken Gesamt-Anisotropie führt. Die anderen in Betracht gezogenen Fälle beziehen sich auf unterschiedliche Typen von Bindungsstellen. Nach partieller Denaturierung eines Teils der Proteinmoleküle könnten die betreffenden Bindungsplätze dem Inhibitor größere Bewegungsfreiheit

gestatten; dagegen spricht der in unterschiedlichen Proteinpräparationen etwa gleichbleibende Anteil der "w"-Komponente. Die alternative Annahme zweier unterschiedlicher Bindungsstellen pro AAC-Dimer widerspricht den gängigen Ansichten über die Bindungsstöchiometrie von CAT und ADP (Klingenberg, 1985). Als weitere Möglichkeit wird noch das Vorliegen des AAC-Proteins in zwei evtl. miteinander im Gleichgewicht stehenden Konformationen angesprochen.

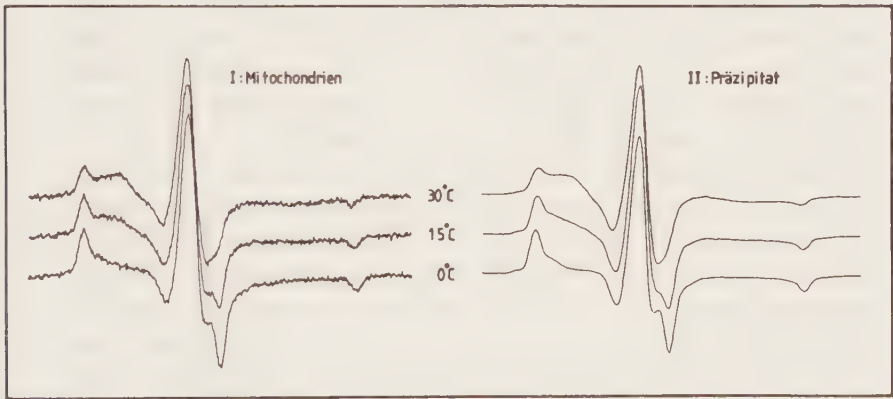


Abb. 23

Temperaturabhängigkeit des konventionellen (V_1 -) ESR-Spektrums von proteingebundenem CATSL

I. In Rinderherzmitochondrien, Versuchsbedingungen wie in Tabelle 11 angegeben. Relative Geräteverstärkung 10.

II. Im durch Cardiolipin induzierten Proteinaggregat, Versuchsbedingungen wie bei Abb. 21 angegeben. Relative Verstärkung 1.

Vom Signal/Rauschen-Verhältnis abgesehen, stimmt die Linienform bei gleicher Temperatur in I und II überein.

Die hier vorgelegten Beobachtungen über das aggregierte und präzipitierte CATSL-AAC-Protein sprechen gegen eine ausschließliche Zuordnung der "w"-Komponente zu nicht proteingebundenen CATSL-Molekülen. Obwohl die Präzipitate kaum Detergens enthalten, an das das CATSL-Molekül unspezifisch binden könnte, ähneln die V_1 -ESR-Spektren dieser Präparationen sehr den an Mitochondrien aufgenommenen Spektren bei gleicher

Temperatur (s. Abb. 23) und zeigen eine deutliche "w"-Komponente.

Die Ergebnisse neuer Phosphoreszenzmessungen mit Carboxyerythrosin-CAT (Finckh, 1987) führten zu der Arbeitshypothese unterschiedlicher Proteinkonformationen in der inneren Mitochondrienmembran, deren Verteilung stark temperaturabhängig ist. Es handelt sich hier um "Subkonformationen", die nicht mit den Hauptkonformationen des AAC-Proteins ("m"- und "c"-Zustand) verwechselt werden dürfen. In den Versuchen mit Carboxyerythrosin-CAT blieb der AAC stets im "c"-Zustand. Die Subkonformationen wurden mit dem katalytischen Transportvorgang des AAC in Verbindung gebracht, der von Konformationsänderungen begleitet sein muß (Finckh, 1987). Sie dürften jedoch nicht den ESR-spektroskopisch beobachtbaren "s"- und "w"-Anteilen entsprechen, da die Zahl dieser postulierten Subzustände weit größer als zwei sein muß.

Die Interpretation der sich aus ST-ESR-Daten ergebenden effektiven Rotationskorrelationszeiten wird natürlich von der Zuordnung der beiden spektralen Komponenten des konventionellen ESR-Spektrums von protein-gebundenem CATSL kritisch beeinflusst. Nur wenn beide spektralen Komponenten auf eine Population von Molekülen zurückgehen, z.B. durch starke Anisotropie der Gesamtbewegung der Spinsonde zustandekommen, können die entsprechenden ST-ESR-Spektren als Einheit aufgefaßt werden. Bei dieser Betrachtungsweise würden dann die drei unterschiedlichen Effektivwerte für τ_r aus den drei diagnostischen Spektralbereichen als Beweis einer stark anisotropen Bewegung aufgefaßt werden. Da die im Vorsatz erwähnte Annahme eine Anisotropie ohnehin nahelegt, hätte die Methode der ST-ESR-Spektroskopie kein grundsätzlich neues Ergebnis erbracht. Ein Abrücken von der o.g. Annahme würde aber bedeuten, daß die den drei spektralen Regionen entnommenen τ_r -Werte durch Überlagerung der Spektren mehrerer Species zustande kommen und die beobachtete Anisotropie damit nur eine scheinbare ist. In diesem Fall wäre eine weitergehende Auswertung bzw. Interpretation der ST-ESR-Spektren nicht sinnvoll.

Nach Hemminga (1986) kann eine Anisotropie in einem ST-ESR-Spektrum folgende Ursachen haben: 1) Nichtsphärische Form der beweglichen Teilchen, 2) anisotrope Umgebung (z.B. Phospholipidmembran), 3) eine begrenzte Bewegung der Spinsonde relativ zum Proteinmolekül; letztere wird von Hemminga durch den Öffnungswinkel eines Kegels beschrieben. Die nach diesem Modell vorhergesagte Temperaturabhängigkeit der effek-

tiven Rotationskorrelationszeiten unterscheidet sich qualitativ von der für CATSL-AAC gemessenen (Abb. 20). Daher dürfte das Kegelmodell hierauf nicht anwendbar sein.

Horvath et al. (1988) interpretieren ihre ST-ESR-Spektren des membranengebundenen CATSL-AAC-Komplexes unter der Annahme, daß die Rotationsachse des Proteins senkrecht zur Membranoberfläche steht. Weiterhin wird nur die "s"-Komponente als proteingebunden betrachtet, eine Korrektur des Beitrages der "w"-Komponente unterbleibt jedoch, weil deren ST-ESR-Integral gleich Null gesetzt wird. Die Berechtigung dieses Schrittes leiten die Autoren aus der Tatsache ab, daß ein ST-ESR-Spektrum von CATSL in Liposomen bzw. Detergensmizellen kein signifikant positives Integral hat. Dies ist zwar konsequent im Hinblick auf die oben erwähnte Annahme ("w" nicht proteingebunden), vermag diese aber natürlich nicht abzusichern. Die Wirksamkeit der Integralmethode bei der Unterdrückung der Signale von weniger immobilisierten Spinsonden ist von diesen Autoren womöglich etwas überschätzt worden. Die verlässliche Auswertung zusammengesetzter ST-ESR-Spektren erfordert nämlich die Kenntnis von Mobilität und Anteil (mol-%) der schwächer immobilisierten Moleküle (vgl. Squier & Thomas 1986 a,b); diese Kenntnisse sind im Fall des AAC-Proteins unzureichend.

Beim jetzigen Kenntnisstand scheint, zusammenfassend betrachtet, eine detaillierte Behandlung der Bewegung des ADP/ATP-Translokators anhand von ST-ESR-Spektren etwas fragwürdig, weil dabei von ungesicherten Annahmen ausgegangen werden muß. Abgesehen vom Problem der spektralen Komponenten ist auch die Geometrie der CATSL-Bindungsstelle noch ungeklärt.

Trotz aller dieser Unsicherheiten sind phänomenologische Vergleiche der ST-ESR-Daten des AAC-Proteins, die unter verschiedenen Versuchsbedingungen erhalten wurden, möglich und sinnvoll. Die hier vorgelegten Ergebnisse geben Auskunft über den Einfluß der Umgebung des Proteins (Detergens, Phospholipid, Protein) und der Temperatur auf die effektiven Rotationskorrelationszeiten des CATSL-AAC-Komplexes unter Zuhilfenahme von Messungen an artifiziellen Proteinaggregaten. Sowohl in diesen als auch in Mitochondrien wurden stark unterschiedliche τ_r -Werte aus dem Amplitudenverhältnis C'/C einerseits und aus L''/L sowie H''/H andererseits abgeleitet (Tabellen 11, 12).

Beim Vergleich der Werte in der Mitochondrienmembran mit denen in den Proteinaggregaten (Tabellen 11 und 12) läßt sich feststellen, daß bei 30°C die im Tieffeldbereich der Spektren erhaltenen τ_r -Werte etwa übereinstimmen, während die schnellere Rotation, die durch den Parameter C'/C repräsentiert wird, in der natürlichen Membran gegenüber dem artifiziellen System um etwa eine Größenordnung verlangsamt ist. Eine mögliche Erklärung hierfür sind spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen in der sehr proteinreichen inneren Mitochondrienmembran. Unspezifische Kontakte zwischen den AAC-Molekülen sind dagegen auch in den Präzipitaten möglich.

Nur die schnelle Rotationsbewegung (τ_r (C'/C)) gehorcht der Gleichung von Arrhenius, während τ_r (L"/L) und τ_r (H"/H) teilweise sogar eine Abnahme bei steigender Temperatur zeigen (s. Abb. 20). Da sich die Linienform besonders im Tieffeldbereich der ST-ESR-Spektren durchaus ändert (s. Abb. 21), ohne das diagnostische Amplitudenverhältnis L"/L wesentlich zu beeinflussen, dürften sich hier mehrere nicht aufgelöste Beiträge überlappen. Ähnliches gilt auch für den Hochfeldbereich der Spektren. Wegen der ungeklärten Natur der "w"-Komponente in CATSL-Spektren kann auch der nichtlineare Verlauf der Auftragungen von $\lg \tau_r$ gegen $1/T$ für τ_r (L"/L) und τ_r (H"/H) zur Zeit noch nicht gedeutet werden (vgl. Squier & Thomas, 1986 b).

Das Amplitudenverhältnis L"/L und die daraus entnommenen τ_r -Werte zeigen beim Einfrieren der Proben (ca. -10°C) eine deutliche Abnahme. Ebenfalls zwischen -8 und -15°C nimmt die Hyperfeinaufspaltung im entsprechenden konventionellen ESR-Spektrums ab; außerhalb dieses Temperaturbereiches wurde, wie erwartet, eine Zunahme von $2A_{zz}$ mit abnehmender Temperatur gefunden (s. auch Munding et al., 1983).

Die Arrhenius-Auftragung von τ_r (C'/C) (Abb. 20) ergibt für Proteinaggregate ohne Cardiolipin-Zusatz eine Aktivierungsenergie von 75 kJ/mol; in derselben Größenordnung liegen die Ergebnisse für cardiolipinhaltige Aggregate und für den AAC in Mitochondrien (Experimente nicht gezeigt). Diese Werte entsprechen größenordnungsmäßig der Aktivierungsenergie des Nukleotidtransports oberhalb 14°C von 60±2 kJ/mol entsprechen (Klingenberg, 1985). Allerdings läßt sich hier eine

direkte Beziehung natürlich nicht herstellen. Die Auftragung für $\tau_r(C'/C)$ in Abb. 20 zeigt im Gegensatz zur Aktivierungsenergie für den Substrattransport keinen Knick bei 14°C. Außerdem fanden Kirino et al. (1976) ST-ESR-spektroskopisch einen ähnlichen Wert (67 kJ/mol) für ATPase aus dem sarcoplasmatischen Reticulum; Größe und Funktion beider Proteine sind aber nicht vergleichbar, abgesehen von der Tatsache, daß beide ATP binden.

Schließlich ergab sich bei den lipidinduzierten AAC-Proteinaggregaten eine deutliche Abhängigkeit der beiden längeren Rotationskorrelationszeiten vom Lipid/Protein-Verhältnis (s. Abb. 22). Sowohl $\tau_r(L''/L)$ als auch $\tau_r(H''/H)$ erreichten ihre Maxima dort, wo maximale Präzipitation eintrat (vgl. Abb. 19, die mit denselben Proben erstellt wurde). Wird mehr Cardiolipin zugegeben, so nimmt die Menge an Präzipitat ab und die Beweglichkeit des Proteins darin zu. Dies dürfte in Zusammenhang mit der abnehmenden Dichte der Protein-Phospholipid-Aggregate stehen, durch die deren schlechtere Sedimentierbarkeit bedingt wird.

Einen qualitativ ähnlichen Effekt fanden Napier et al. (1987) ST-ESR-spektroskopisch an (Ca^{++}, Mg^{++}) -ATPase aus dem sarcoplasmatischen Reticulum. Das Enzym wurde zunächst mit einer Maleimid-Spinsonde markiert. In Präparaten, denen das Lipid teilweise entzogen worden war, lagen alle drei effektiven Rotationskorrelationszeiten erheblich höher als in der nativen Membran. Die Autoren führen dies auf Protein-Protein-Wechselwirkungen zurück. Quantitativ fallen diese Unterschiede erheblich größer aus als in den Cardiolipin-Komplexen des AAC-Proteins. Möglicherweise hängt das mit dem großen Wassergehalt dieser Präzipitate zusammen, der eine unmittelbare Berührung der Proteinmoleküle verhindert. Es ist interessant, festzustellen, daß auch im ganz anders strukturierten System des sarcoplasmatischen Reticulums der spektrale Parameter C'/C eine um etwa eine Größenordnung schnellere Bewegung widerspiegelt als die beiden anderen Amplitudenverhältnisse $(L''/L, H''/H)$.

Eine ins Einzelne gehende Interpretation anisotroper ST-ESR-Spektren wird wohl erst nach der zufriedenstellenden Simulation aller denkbaren Fälle möglich sein. Die hier vorgelegten, wenig verrauschten Spektren bieten dafür eine Grundlage.

6. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie wurden die Protein-Lipid-Wechselwirkungen des mitochondrialen ADP/ATP-Translokators untersucht. Aus Gründen der Stabilisierung seiner Tertiärstruktur wurde dabei vorzugsweise der Carboxyatractylosid-Komplex dieses Proteins eingesetzt. Als Detergens diente Triton X-100, das sich zur Isolierung dieses Membranproteins am besten eignet (Klingenberg, 1985).

Konventionelle ESR-Spektroskopie an spinmarkierten Fettsäuren und Phospholipiden erbrachte folgende Ergebnisse:

- 1) Das AAC-Protein zeigt eine auffallende Selektivität für negativ geladene Lipide. In der Reihe

CL > PA > SA > PG > PE > PC

nimmt die Affinität zum Protein, die sich durch relative Bindungskonstanten ausdrücken läßt, ab.

- 2) Die Bindung der Phospholipide Cardiolipin und Phosphatidsäure ließ sich in Form von Auftragungen nach Scatchard darstellen. Wegen der experimentellen Ungenauigkeiten konnte zwischen einem linearen und einem nach oben konkaven Kurvenverlauf nicht eindeutig unterschieden werden. Ersterer ergab zwei Bindungsstellen pro Proteindimer; im anderen Falle käme eine große, hier nicht bestimmbare Zahl weiterer Bindungsstellen mit geringer Affinität hinzu. Diese können der "boundary layer" zugeordnet werden. Für Stearinsäure wurde nur dieser letztere Typ von Bindungsstellen gefunden.
- 3) Es besteht eine Abhängigkeit der Phospholipidbindung von der Detergensenkonzentration. Ein Überschuß an Triton X-100 vermag einen Teil der gebundenen Lipidmoleküle zu verdrängen.
- 4) Die hier beschriebene Cardiolipinbindung dürfte wahrscheinlich andere Bindungsplätze betreffen als die NMR-spektroskopisch beobachtete (Beyer & Klingenberg, 1985).
- 5) Die Abhängigkeit der Bindung von CLSL, PASL und SASL von Ionenstärke und pH-Wert zeigt, daß sie z.T. elektrostatischer Natur ist.

- 6) Der Einsatz von spezifischer Aminosäure-Reagentien erbrachte Hinweise darauf, daß sowohl Lysin- als auch Argininreste an der Bindung negativ geladener Phospholipide an das AAC-Protein beteiligt sind.
- 7) Die immobilisierten Phospholipide sind weder im Innern des Proteins eingeschlossen noch in Protein-Aggregaten eingeklemmt, da sie nicht nur für Ascorbat, sondern auch für das Enzym Phospholipase A₂ zugänglich sind.
- 8) In Anwesenheit eines etwa 2- bis 10-fachen molaren Überschusses doppelt negativ geladener Phospholipide neigt das AAC-Protein zu Aggregation und Präzipitation. Das aggregierte Protein denaturiert nicht und verbleibt im "c"-Zustand. Bei Zugabe größerer Lipidmengen bilden sich keine zentrifugierbaren Aggregate. Einfach negativ geladene Lipide wie PG und Fettsäuren führten nicht zu diesem Aggregationseffekt. Als mögliche Erklärung wird eine Vernetzung der proteinhaltigen Mizellen bei gleichzeitiger Kompensation der Oberflächenladungen des Proteins diskutiert.

Diese Proteinaggregate stellen zwar ein artifizielles System dar, bieten jedoch die Möglichkeit, das AAC-Protein ohne Denaturierung in konzentrierter Form zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde der CATSL-Komplex des AAC präpariert und die nach Zugabe von Cardiolipin gebildeten Aggregate mit Hilfe der Saturation Transfer-ESR-Spektroskopie untersucht. Auf diese Weise sollte die Bewegung des Translokator-Proteins selbst untersucht werden. Dabei ergab sich:

- 9) Das AAC-Protein bewegt sich offenbar auch im Aggregat anisotrop, was in Phospholipidmembranen bereits festgestellt wurde. Dagegen dürften sich die proteinhaltigen Detergens-Mizellen in guter Näherung isotrop bewegen, allerdings so schnell, daß die Grenze der Methode erreicht wird. Ausschließlich durch Detergens-Entzug erzeugte Präzipitate zeigten nahezu identische spektroskopische Eigenschaften wie die lipidhaltigen.
- 10) Mit zunehmendem Cardiolipinanteil nimmt die Beweglichkeit des Proteins in den Aggregaten zu, die Anisotropie dagegen ab. Dieser Effekt geht Hand in Hand mit der erwähnten schlechteren Sedimentierbarkeit der Aggregate. Eine teilweise Substitution des Cardiolipins durch Lecithin blieb ohne Einfluß.

7. Anhang

7.1. Die Beständigkeit der Konformation des AAC bei pH-Änderungen

Ebenso gut wie mit Hilfe von tritiiertem CAT kann die Erhaltung der Inhibitorbindung und damit der Tertiärstruktur des AAC-Proteins auch ESR-spektroskopisch überprüft werden. Das Spektrum des proteingebundenen spinmarkierten Inhibitors CATSL ist nämlich sehr charakteristisch (Munding et al., 1983). Es wurden daher Titrationsen von Proben des solubilisierten CATSL-AAC-Komplexes mit NaOH und HCl durchgeführt. Etwa bei jeder vollen pH-Einheit wurde eine kleine Probe entnommen und ESR-spektroskopisch untersucht.

Im alkalischen Bereich sind alle aziden Gruppen des CATSL-Moleküls dissoziiert und dieses daher gut wasserlöslich; das ESR-Spektrum des freigesetzten Inhibitors ist von dem des proteingebundenen Anteils vollkommen getrennt (s. Abb. 24), so daß eine unmittelbare Quantifizierung durch Messung der Signalamplituden möglich ist. Bis einschließlich pH 10 blieb die Hauptmenge des Inhibitors gebunden, bei pH 11 war das Spektrum der stark immobilisierten, proteingebundenen Komponente nicht mehr erkennbar (s. Abb. 24, 25, "s").

Carboxyatratylosid besitzt neben zwei Sulfonsäureresten noch zwei geminale Carboxylgruppen. Die einfachste Verbindung mit geminalen COOH-Gruppen ist die Malonsäure, deren pK_s -Werte mit 2,8 für die erste und 5,8 für die zweite Dissoziationsstufe angegeben werden. Bei CAT und CATSL dürften diese Werte eher etwas höher liegen, da hier Wasserstoff durch Alkylreste ersetzt ist. Daher liegen im Bereich starker saurer pH-Werte die Carboxylgruppen des CATSL-Moleküls zumindest teilweise undissoziiert vor. Nach Klingenberg (1985) binden an das AAC-Protein nur Liganden mit mindestens drei negativen Ladungen, so daß nach Protonierung beider Carboxylgruppen keine Proteinbindung des CATSL-Moleküls mehr zu erwarten ist. Gleichzeitig nimmt die Wasserlöslichkeit stark ab; der CATSL verbleibt daher nach Freisetzung ganz überwiegend in den Detergens-Mizellen. Die Spektren von freiem und proteingebundenem CATSL überlagern sich daher erheblich (s. Abb. 26); deshalb wurde die entsprechende Versuchsreihe nur qualitativ beurteilt. Eine deutliche Freisetzung des Inhibitors erfolgte unterhalb von pH 5, bei pH 3 war nichts mehr spezifisch an den AAC gebunden.

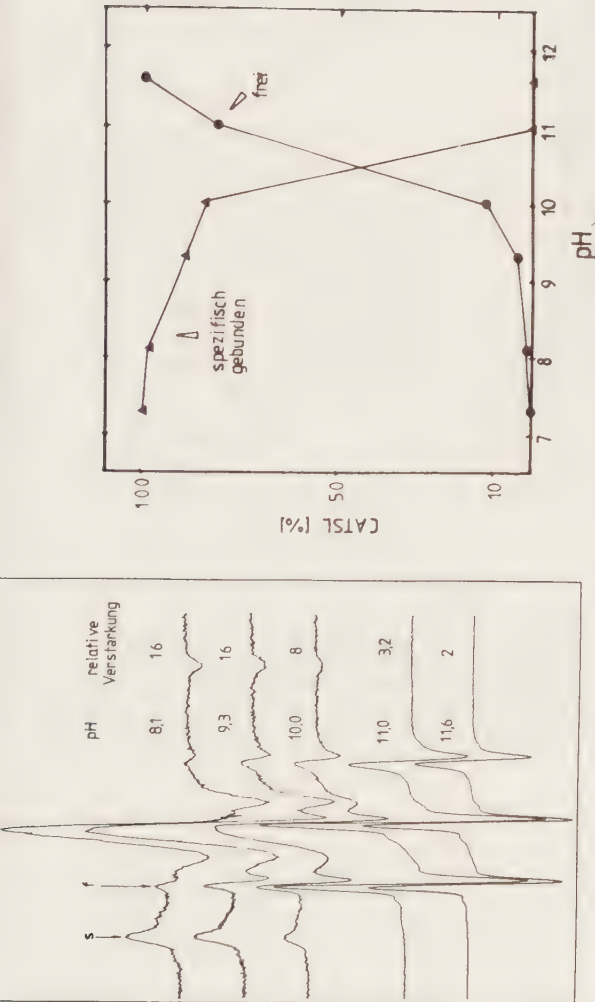


Abb. 24 und 25

Das Bindungsverhalten des spinmarkierten Protein-Inhibitors (CATSL in alkalischem Medium)

Der CATSL-AAC-Komplex wurde wie im Methodenteil beschrieben dargestellt und auf eine Konzentration von 4 mg/ml druckdialysiert. Praktisch die gesamte Menge des Inhibitors war spezifisch an das Protein gebunden (vgl. erstes Spektrum). Diese Probe wurde anschließend mit NaOH titriert und etwa bei jeder vollen pH-Einheit ein ESR-Spektrum bei 0°C aufgenommen (Abb. 24). Den Spektren wurden dann die Amplituden der Tieffeldlinien des proteingebundenen ("s") sowie des wasserlöslichen ("f") Anteils des CATSL entnommen (s. Pfeile in Abb. 24). Das erste bzw. letzte Spektrum ermöglichte die Normierung der Amplituden auf die vorhandene Gesamtmenge des Inhibitors. Abb. 25 zeigt das Ergebnis in Form einer Titrationskurve. Die spezifische Bindung geht zwischen pH 10 und pH 11 verloren. Hinweise auf eine Zeitabhängigkeit der Inhibitorbindung ergaben sich nicht.

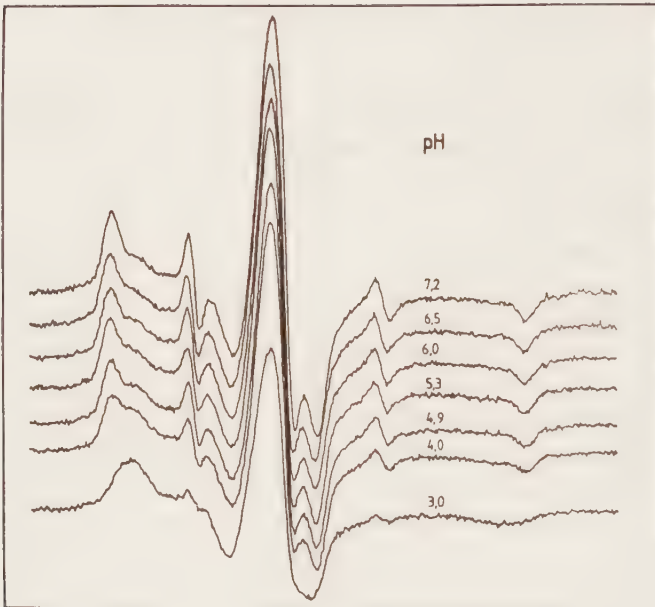


Abb. 26

Linienform des spinmarkierten Inhibitors CATSL in Anwesenheit des AAC-Proteins bei sauren pH-Werten.

Es wurde analog wie bei dem in Abb. 24 dargestellten Experiment verfahren. Zur Titration wurde Salzsäure verwendet. Bei $\text{pH} = 3$ muß bereits mit einem Angriff auf die Nitroxylgruppe gerechnet werden (Gaffney, 1976); möglicherweise ist deshalb die Amplitude des entsprechenden Spektrums erniedrigt. Auf eine Quantifizierung wurde wegen der starken Überlappung der spektralen Komponenten verzichtet (s.Text).

7.2. Die Verdrängung des spinmarkierten Inhibitors CATSL durch

Pyridoxalphosphat

Die Beeinflussung der Bindung der drei Inhibitoren CAT, ATR und BKA durch PLP wurde bereits von Bogner et al. (1986) untersucht, allerdings nur bei pH 8 und mit PLP-Konzentrationen bis 8 mM. Unter diesen Bedingungen wurde keine Abdissoziation von gebundenen CAT durch nachträglich zugegebenes Pyridoxalphosphat beobachtet, während ATR und BKA teilweise freigesetzt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine möglichst vollständige Umsetzung der Lysinreste angestrebt, soweit sie von der Wasserphase her überhaupt zugänglich sind. Dazu waren höhere Konzentrationen an PLP erforderlich, da mit 6 mM noch keine Sättigung des PLP-Einbaus erzielt werden konnte (Bogner et al., 1986). Auch eine Erhöhung des pH-Wertes könnte zu vollständigerem Umsatz führen, da dabei die Konzentration der reaktiven Aminoform der ϵ -NH₂-Gruppe von Lysin vergrößert wird. Um die Beständigkeit der Inhibitorbindung und damit den Erhalt der Tertiärstruktur des AAC zu überprüfen, wurde wiederum der spinmarkierte Inhibitor CATSL eingesetzt; dieser bindet allerdings mit etwas geringerer Affinität an den AAC als das unmarkierte CAT (Munding et al., 1983).

Der CATSL-AAC-Komplex wurde wie im Methodenteil beschrieben dargestellt (3,8 mg/ml Protein). Ein Teil dieser Probe wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 10,0 gebracht, der Rest wurde bei pH 7,5 belassen. Aliquots wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von PLP jeweils bei Raumtemperatur 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die bei 0°C aufgenommenen ESR-Spektren wurde wie im Falle der pH-Abhängigkeit quantitativ ausgewertet (s. Abschnitt 7.1.). Das Ergebnis (s. Abb. 27) bestand in einer partiellen Freisetzung des proteingebundenen Inhibitors durch das Modifizierungsreagens; der Kurvenverlauf ähnelt dem von Bogner et al. (1986) für ATR gemessenen, doch erwies sich CATSL wie erwartet als beständiger gegenüber PLP. In alkalischem Medium wurde eine nach unten verschobene Bindungskurve erhalten, da bei pH 10 bereits etwas CATSL freigesetzt wird (s.o.). Die Wirkung von Pyridoxalphosphat war aber in beiden Fällen etwa die gleiche (s. Abb. 27).

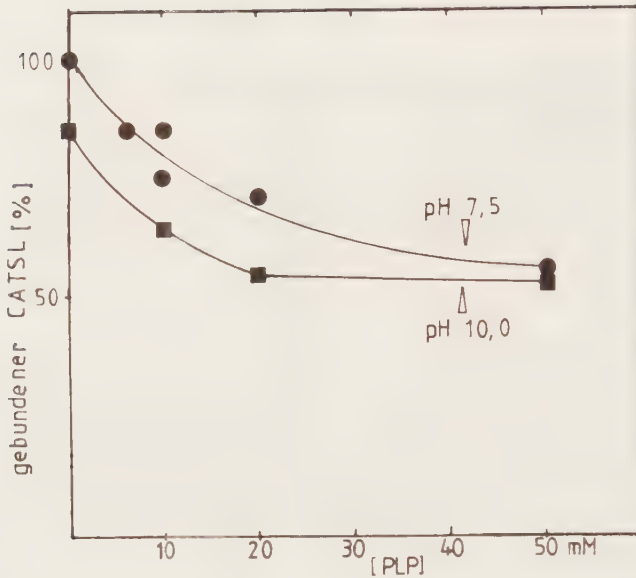


Abb. 27

Verdrängung von gebundenem CATSL durch Pyridoxalphosphat

Proben des CATSL-AAC-Komplexes (3,8 mg Protein/ml) wurden auf pH-Werte von 7,5 bzw. 10,0 eingestellt. Nach Aufnahme der ESR-Spektren wurden die Proben aufgeteilt und mit unterschiedlichen Mengen PLP jeweils 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte durch Amplitudenmessungen, wie unter den Abb. 24/25 erläutert.

8. Abkürzungen

AAC	ADP/ATP-Translokatorprotein aus der inneren Membran von Rinderherzmitochondrien
ATR	Atractylosid (spezifischer Inhibitor des AAC)
BKA	Bongkreksäure (spezifischer Inhibitor des AAC)
CAT	Carboxy-Atractylosid (spezifischer Inhibitor des AAC)
CATSL	Spinmarkiertes Analogon von CAT, das ebenfalls spezifisch an den AAC bindet
CL	Cardiolipin, Diphosphatidylglycerol
12-CLSL	Am 12. Kohlenstoffatom der sn_2 -Fettsäurekette spinmarkiertes Cardiolipin
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
NEM	N-Ethyl-Maleimid
NMR	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie
PA	Phosphatidsäure
12-PASL	In 12. Position der sn_2 -Fettsäurekette spinmarkierte Phosphatidsäure
5-PASL	In 5. bzw. 16. Position spinmarkierte Phosphatidsäure
16-PASL	
PC	Phosphatidylcholin (Lezithin)
12-PCSL	In 12. Position spinmarkiertes Phosphatitylcholin
5-PCSL	In 5. Position spinmarkiertes Lezithin
PE	Phosphatidylethanolamin (Kephalin)
12-PESL	In 12. Position spinmarkiertes Phosphatidylethanolamin
PG	Phosphatidylglycerol
12-PGSL	In 12. Position spinmarkiertes Phosphatidylglycerol
PLP	Pyridoxal-5-phosphat
SA	Stearinsäure
12-SASL	Am 12. Kohlenstoffatom mit einer "Doxyl"-Gruppe versehene (spinmarkierte) Stearinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST-ESR	Saturation Transfer Elektronenspin-Resonanz

9. Literatur

- Abramson, M.B., Katzman, R., Wilson, C.E. & Gregor, H.P. (1964) "Ionic Properties of Aqueous Dispersions of Phosphatidic Acid", J. Biol. Chem. 239, 4066 - 4072
- Ansell, G.B. & Hawthorne, J.N. (1964) "Preparation of Phospholipids" in "Phospholipids" (Ansell, G.B. & Hawthorne, J.N. eds.), pp 85 - 113, Elsevier, Amsterdam
- Aquila, H., Babel, W. & Klingenberg, M. (1978) "Isolation of the ADP/ATP Translocator from Beef Heart Mitochondria as the Songkrekate-Protein Complex", Eur. J. Biochem. 85, 549 - 560
- Aquila, H. & Klingenberg, M. (1982) "The Reactivity of -SH Groups in the ADP/ATP Carrier Isolated from Beef Heart Mitochondria", Eur. J. Biochem. 122, 141 - 145
- Aquila, H., Misra, D., Eulitz, M., & Klingenberg, M. (1982) "Complete Amino Acid Sequence of the ADP/ATP Carrier from Beef Heart Mitochondria", Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 345 - 349
- Aquila, H., Link, T.A. & Klingenberg, M., (1987) "Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family", FEBS Lett. 212, 1 - 9
- Beth, A.H., Balasubramanian, K., Robinson, B.H., Dalton, L.R., Venkataramu, S.D., & Park, J.H. (1983) "Sensitivity of V_2 Saturation Transfer Electron Paramagnetic Resonance Signals to Anisotropic Rotational Diffusion with ^{15}N /Nitroxide Spin Labels. Effect of Noncointident Magnetic and Diffusion Tensor Principal Axes", J. Phys. Chem. 87, 358 - 367
- Seyer, K. & Klingenberg, M. (1983) "Reincorporation of Adenosine 5'-Diphosphate/Adenosine 5'-Triphosphate Carrier into Phospholipid Membranes. Phospholipid-Protein Interaction as Studied by Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance and Electron Microscopy", Biochemistry 22, 639 - 645
- Seyer, K. & Klingenberg, M. (1985) "ADP/ATP-Carrier Protein from Beef Heart Mitochondria Has High Amounts of Tightly Bound Cardiolipin, as Revealed by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance", Biochemistry 24, 3801 - 3806

- Blair, P.V. (1967) "The Large-Scale Preparation and Properties of Heart Mitochondria from Slaughterhouse Material", *Methods in Enzymol.* 10, 78 - 81
- Blight, E.G. & Dyer, W.J. (1959) *Can. J. Biochem.* 37, 911 - 917, wiedergegeben in Kates, M., "Techniques of Lipidology" (Work, T.S. & Work, E., eds), Vol. 3, Part II, pp 349 - 353
- Block, M.R., Lauquin, G.J.M. & Vignais, P.V. (1981) "Chemical Modification of Atractyloside and Bongkrecic Acid Binding Sites of the Mitochondrial Adenine Nucleotide Carrier. Are There Distinct Binding Sites", *Biochemistry* 20, 2692 - 2699
- Boeyens, J.C.A. & McConnell, H.M. (1967) "Spin-Labeled Hemoglobin", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 56, 22 - 25
- Bogner, W., Aquila, H. & Klingenberg, M. (1982) "Surface Labeling of membrane-bound ADP/ATP-carrier by pyridoxal phosphate", *FEBS Lett.* 146, 259 - 261
- Bogner, W., Aquila, H. & Klingenberg, M. (1986) "The transmembrane arrangement of the ADP/ATP carrier as elucidated by the lysine reagent pyridoxal 5-phosphate", *Eur. J. Biochem.* 161, 611 - 620
- Borders, C. I. Jr. & Riordan, J.F. (1975) "An Essential Arginyl Residue at the Nucleotide Binding Site of Creatine Kinase", *Biochemistry* 14, 4619 - 4704
- Boss, W.F., Kelley, C.J. & Landsberger, F.R. (1975) "A Novel Synthesis of Spin Label Derivatives of Phosphatidylcholin", *Anal. Biochem.* 64, 289 - 292
- Brophy, P.J., Horvath, L.I. & Marsh, D. (1984) "Stoichiometry and Specificity of Lipid-Protein Interaction with Myelin Proteolipid Protein Studied by Spin-Label Electron Spin Resonance", *Biochemistry* 23, 860 - 865
- Cable, M.B., Jacobus, J. & Powell, G.L. (1978) "Cardiolipin: A stereospecifically spin-labeled analogue and its specific enzymatic hydrolysis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 2227 - 2231
- Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) "Ligand interactions at equilibrium" in "Biophysical Chemistry" (Cantor, R.C. & Schimmel, P.R., eds.), Vol 3, pp 849 - 866, Freeman, San Francisco

- Chapman, D. (1982) "Protein-Lipid Interactions in Model and Natural Biomembranes" in "Biological Membranes" (Chapman, D., ed.), Vol. 4, p. 202, Academic Press, London
- Cheneval, D. & Carafoli, E. (1988) "Identification and primary structure of the cardiolipin-binding domain of mitochondrial creatine kinase", *Eur. J. Biochem.* 171, 1 - 9
- Colbeau, A., Nachbaur, J. & Vignais, P.M. (1971) "Enzymatic Characterization and Lipid Composition of Rat Liver Subcellular Membranes", *Biochim. Biophys. Acta* 249, 462 - 492
- Comfurius, P. & Zwaal, R.F.A. (1977) "The Enzymatic Synthesis of Phosphatidylserine and Purification by CM-Cellulose Chromatography", *Biochim. Biophys. Acta* 488, 36 - 42
- Cortese, J.D. & Fleischer, S. (1987) "Noncooperative vs. Cooperative Reactivation of D- β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase: Multiple Equilibria for Lecithin Binding are Determined by the Physical State (Soluble vs. Bilayer) and Composition of the Phospholipids", *Biochemistry* 26, 5283 - 5293
- Davis, J.H. (1983) "The Description of Membrane Lipid Composition, Order and Dynamics by ^2H -NMR", *Biochim. Biophys. Acta* 737, 117 - 171
- Daum, G. (1985) "Lipids of Mitochondria" *Biochim. Biophys. Acta* 822, 1 - 42
- Deems, R.A. & Dennis, E.A. (1981) "Phospholipase A_2 from Cobra Venom (*Naja naja naja*)", *Methods in Enzymol.* 71, 703 - 710
- De Kruijff, B. & Cullis, P.R. (1980) "The influence of poly(l-lysine) on phospholipid polymorphism. Evidence that electrostatic polypeptide-phospholipid interaction can modulate bilayer - non-bilayer transitions", *Biochim. Biophys. Acta* 601, 235 - 240
- Dennis, E.A. (1973) "Kinetic dependence of phospholipase A_2 activity on the detergent Triton X-100", *J. Lipid. Res.* 14, 152 - 159
- Devaux, P.F. & Seigneuret, M. (1985) "Specificity of lipid-protein interactions as determined by spectroscopic techniques", *Biochim. Biophys. Acta* 822, 63 - 125
- Edsall, J.T. & Wyman, J. (1958) in "Biophysical Chemistry" (Edsall, J.T. & Wyman, J., eds.), Academic Press, New York
- Eibl, H. & Blume, A. (1979) "The Influence of Charge on Phosphatidic Acid Bilayer Membranes", *Biochim. Biophys. Acta* 553, 476 - 488

- Esmann, M., Watts, A. & Marsh, D. (1985) "Spin-Label Studies of Lipid-Protein Interactions in $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase Membranes from Rectal Glands of *Squalus acanthias*", *Biochemistry* 24, 1386 - 1393
- Evans, C.A. (1981) "Use of the Integral of Saturation Transfer Paramagnetic Resonance Spectra to Determine Molecular Rotational Correlation Times. Slowly Tumbling Spin Labels in the Presence of Rapidly Tumbling Spin Labels", *J. Magn. Res.* 44, 109 - 116
- Fajer, P. & Marsh, D. (1982) "Microwave and Modulation Field Inhomogenities and the Effect of Cavity Q in Saturation Transfer ESR Spectra. Dependence on Sample Size", *J. Magn. Res.* 49, 212 - 224
- Finckh, P. (1987) "Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie an Aromaten als Sonde für die Proteindynamik und für den Mechanismus des Elektronentransfers", Dissertation, Technische Universität München
- Fransen-Zeilstra, E.M. & Wara, J.P. (1985) "Synthesis of a Spin-Labelled Monoacylglycerol" *Chem. Phys. Lipids* 34, 381 - 385
- Gaffney, B.J. (1976) "The Chemistry of Spin Labels" in "Spin Labeling" (Berliner, L.J., ed.), Vol. 1, pp 184 - 239, Academic Press, New York
- Glazer, A.N. (1976) "The Chemical Modification of Proteins by Group-Specific and Site-Specific Reagents" in "The Proteins" (Neurath, H. & Hill, R.L. eds.), Vol.2, pp 2 - 105, Academic Press, New York
- Grover, A.K., Slotboom, A.J., De Haas, G.H. & Hammes, G.G. (1975) "Lipid Specificity of β -Hydroxybutyrate Dehydrogenase Activation", *J. Biol. Chem.* 250, 31 - 38
- Gwak, S.H. & Powell, G.L. (1982) "The Association of Cardiolipin with Detergent-Solubilized Cytochrome c Oxidase", *Biophys. J.* 37, 108 - 109
- Hackenberg, H. (1979) "Molekulargewicht und hydrodynamische Eigenschaften des mitochondrialen ADP,ATP Translokators in Detergenzien", Dissertation, Universität München
- Hackenberg, H. & Klingenberg, M. (1980) "Molecular Weight and Hydrodynamic Parameters of the Adenosine 5'-Disphosphate - Adenosine 5'-Triphosphate Carrier in Triton X-100", *Biochemistry* 19, 548 - 555

- Hartsel, S.C., Moore, C.R., Raines, D.E. & Cafiso, D.S. (1987) "Time-Dependent Binding of Paramagnetic and Fluorescent Hydrophobic Ions to the Acetylcholine Receptor from Torpedo", *Biochemistry* 26, 3253 - 3260
- Helenius, A. & Simons, K. (1972) "The Binding of Detergents to Lipophilic and Hydrophilic Proteins", *J. Biol. Chem.* 247, 3656 - 3661
- Hemminga, M.A. (1983) "Interpretation of ESR and Saturation Transfer ESR Spectra of Spin Labeled Lipids and Membranes", *Chem. Phys. Lipids* 32, 323 - 383
- Hemminga, M.A. & Faber, A.J. (1986) "Analysis of Anisotropic Spin-Label Motion in Saturation-Transfer ESR Spectra of Spin-Labeled Cowpea Chlorotic Mottle Virus", *J. Magn. Res.* 66, 1 - 8
- Horvath, L.I., Munding, A., Beyer, K., Klingenberg, M. & Marsh, D. (1988) "Rotational Diffusion of Mitochondrial ADP/ATP Carrier Studied by Saturation Transfer Electron Spin Resonance", *Biochemistry*, in Druck
- Hyde, J.S. & Dalton, L.R. (1979) "Saturation-Transfer Spectroscopy" in "Spin Labeling" (Berliner, L.J., ed.), Vol. 2, pp 3 - 70, Academic Press, New York
- Ito, T., & Ohnishi, S.I. (1974) " Ca^{2+} -Induced Lateral Phase Separations in Phosphatidic Acid-Phosphatidylcholine Membranes", *Biochim Biophys. Acta* 352, 29 - 37
- Jost, P.C., Griffith, O.H., Capaldi, R.A. & Vanderkooi, G. (1973) "Evidence for Boundary Lipid in Membranes", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 480 - 484
- Kadenbach, B., Mende, P., Kolbe, H.U.J., Stipani, I. & Palmieri, F. (1982) "The Mitochondrial Phosphate Carrier has an Essential Requirement for Cardiolipin", *FEBS Lett.* 139, 109 - 112
- Keana, J.F.W. (1979) "New Aspects of Nitroxide Chemistry" in "Spin Labeling" (Berliner, L.J., ed.), Vol. 2, pp 115 - 173, Academic Press, New York
- Kirino, Y., Ohkuma, T. & Shimizu, H. (1978) "Saturation transfer electron spin resonance study on the rotational diffusion of calcium- and magnesium-dependent adenosine triphosphatase in sarcoplasmic reticulum membranes", *J. Biochem (Tokio)* 884, 111 - 115

- Klingenberg, M. (1978) "Transportkatalyse in Biomembranen, erläutert am Beispiel des ADP,ATP-Carriers der Mitochondrien", *Naturwissenschaften* 65, 456 - 461
- Klingenberg, M. (1985) "The ADP/ATP Carrier in Mitochondrial Membranes" in "The Enzymes of Biological Membranes" (Martonosi, A.N., ed.), Vol. 4, pp. 511 - 553, Plenum Press, New York
- Klingenberg, M. & Appel, M. (1980) "Is there a common binding center in the ADP,ATP carrier for substrate and inhibitors?", *FEBS Lett.* 119, 195 - 199
- Klingenberg, M., Aquila, H. & Riccio, P. (1979) "Isolation of Functional Membrane Proteins Related to or Identical with the ADP,ATP-Carrier of Mitochondria", *Methods in Enzymol.* 56, 407 - 414
- Krämer, R. & Klingenberg, M. (1977) "Reconstitution of Adenine Nucleotide Transport with Purified ADP,ATP-Carrier Protein", *FEBS Lett.* 82, 363 - 367
- Krämer, R. & Klingenberg, M. (1980) "Enhancement of Reconstituted ADP,ATP Exchange Activity by Phosphatidylethanolamine and by Anionic Phospholipids", *FEBS Lett.* 119, 257 - 260
- Krämer, R., Kürzinger, G., & Heberger, C. (1986) "Isolation and Functional Reconstitution of the Aspartate/Glutamate Carrier from Mitochondria", *Arch. Biochem. Biophys.* 241, 166 - 174
- Krebs, J.J.R., Hauser, H. & Carafoli, E. (1979) "Asymmetric Distribution of Phospholipids in the Inner Membrane of Beef Heart Mitochondria", *J. Biol. Chem.* 254, 5308 - 5316
- Kuppe, A., Mrsny, R.J., Shimizu, M., Firsan, S.J., Keana, J.F.W. & Griffith, O.H. (1987) "Labeling of Bovine Heart Cytochrome c Oxidase with Analogues of Phospholipids. Synthesis and Reactivity of a New Cardiolipin Benzaldehyde Probe", *Biochemistry* 26, 7693 - 7701
- Lee, T.D., Birrell, G.B., Bjorkman, P.J. & Keana, J.F.W. (1979) "Azethoxyl Nitroxide Spin Labels. ESR Studies Involving Thiourea Crystals, Model Membrane Systems and Chromophores, and Chemical Reduction with Ascorbate and Dithiothreitol", *Biochim. Biophys. Acta* 550, 369 - 383
- Lowry, O.R., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, A.J. (1951) "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275

- Mantsch, H.H., Yang, P.W. & Casal, H.L. (1986) "Infrared Spectrometry of Living Systems: Current Trends and Perspectives", *J. Mol. Struct.* 141, 237 - 242
- Marsh, D. (1980) "Molecular Motion in Phospholipid Bilayers in the Gel Phase: Long Axis Rotation", *Biochemistry* 19, 1632 - 1637
- Marsh, D. (1981) "Electron Spin Resonance: Spin Labels" in "Membrane Spectroscopy" (Grell, E., ed.), pp 51 - 142, Springer Verlag, Berlin
- Marsh, D. (1985) "ESR spin label studies of Lipid-protein interactions" in "Progress in Protein-Lipid Interactions" (Watts, A. & DePont, J.J.H.H.M., ed.), Vol.1, pp 143 - 172, Elsevier, Amsterdam
- Marsh, D., Watts, A. & Barrantes, F.J. (1981) "Phospholipid Chain Immobilization and Steroid Rotational Immobilization in Acetylcholine Receptor-Rich Membranes from *Torpedo marmorata*", *Biochim. Biophys. Acta* 645, 97 - 101
- Marsh, D., Watts, A., Pates, R.D., Uhl, R., Knowles, P.F. & Esmann, M. (1982) "ESR Spin Label Studies of Lipid-Protein Interactions in Membranes", *Biophys. J.* 37, 265 - 274
- McMillen, D.A., Volwerk, J.J., Ohishi, J., Erion, M., Keana, J.F.W., Jost, P.C. & Griffith, O.H. (1986) "Identifying Regions of Membrane Proteins in Contact with Phospholipid Head Groups: Covalent Attachment of a New Class of Aldehyde Lipid Labels to Cytochrome c Oxidase", *Biochemistry* 25, 182 - 193
- Mende, P., Hüther, F.J. & Kadenbach, B. (1983) "Specific and reversible activation and inactivation of the mitochondrial phosphate carrier by cardiolipin and nonionic detergents, respectively", *FEBS Lett.* 158, 331 - 334
- Müller, M., Krebs, J.J.R., Cherry, R.J & Kawato, S. (1984) "Rotational Diffusion of the ADT/ATP Translocator in the Inner Membrane of Mitochondria and in Proteoliposomes", *J. Biol. Chem.* 259, 3037 - 4043
- Müller, M., Moser, R., Cheneval, D. & Carafoli, E. (1985) "Cardiolipin is the Membrane Receptor for Mitochondrial Creatine Phosphokinase", *J. Biol. Chem.* 260, 3839 - 3843
- Munding, A., Beyer, K. & Klingenberg, M. (1983) "Binding of Spin-Labeled Carboxyatractylate to Mitochondrial Adenosine 5'-Diphosphate/Adenosine 5'-Triphosphate Carrier as Studied by Electron Spin Resonance", *Biochemistry* 22, 1941 - 1947

- Munding, A., Drees, M., Beyer, K. & Klingenberg, M. (1987) "Probing of Sulfhydryl Groups in the Adenosine 5'-diphosphate/Adenosine 5'-triphosphate Carrier by Maleimide Spin Labels", *Biochemistry* 26, 8637 - 8644
- Napier, R.M., East, J.M. & Lee, A.G. (1987) "State of aggregation of the $(Ca^{2+} Mg^{2+})$ -ATPase studied using saturation-transfer electron spin resonance", *Biochim. Biophys. Acta* 903, 365 - 373
- Okuyama, H. & Nojima, S. (1965) "Studies on Hydrolysis of Cardiolipin by Snake Venom Phospholipase A", *J. Biochem. (Tokio)* 57, 529 - 538
- Onishi, H. & Morales, M.F. (1976) "States of Myosin Subfragment-1 Studied by Ascorbate Reduction of Bound Spin Label", *Arch. Biochem. Biophys.* 172, 12 - 19
- Op den Kamp, J.A.F. (1979) "Lipid Asymmetry in Membranes", *Ann. Rev. Biochem.* 48, 47 - 71
- Pember, S.O., Powell, G.L. & Lambeth, J.D. (1983) "Cytochrome P-450_{SCC} - Phospholipid Interactions", *J. Biol. Chem.* 258, 3198 - 3206
- Percival, P.W. & Hyde, J.S. (1976) "Saturation-Recovery Measurements of the Spin-Lattice Relaxation Times of Some Nitroxides in Solution", *J. Magn. Res.* 23, 249 - 257
- Peters, R.G., Jones, W.C. & Cromartie, T.H. (1981) "Inactivation of L-Lactate Monooxygenase with 2,3-Butanedione and Phenylglyoxal", *Biochemistry* 20, 2564 - 2571
- Petz, D., Löffler, H.G. & Schneider, F. (1979) "Inhibition of E.coli L-Asparaginase by Reaction with 2,3-Butanedione. Chemical Modification of Arginine and Histidine Residues", *Zeitschr. Naturforsch.* 34c, 742 - 746
- Poore, V.M., Fitzsimons, J.T.R. & Ragan, C.I. (1982) "The Effects of Lipid Fluidity on the Rotational Diffusion of Complex I and Complex III in Reconstituted NADH-Cytochrome c Oxidoreductase", *Biochem. Biophys. Acta* 693, 113 - 124
- Powell, G.L. & Abramavitch, D.A. (1986) "Aggregation of Cytochrome c Oxidase as a Function of Cardiolipin Content", *Fed. Proc.* 45, 1834 (Abstract)

- Powell, G.L., Knowles, P.F. & Marsh, D. (1985) "Association of spin-labelled cardiolipin with dimyristoyl-phosphatidylcholine-substituted bovine heart cytochrome c oxidase", *Biochim. Biophys. Acta* 816, 191 - 194
- Powell, G.L., Knowles, P.F. & Marsh, D. (1987) "Spin-Label Studies on the Specificity of Interaction of Cardiolipin with Beef Heart Cytochrome Oxidase", *Biochemistry* 26, 8138 - 8145
- Quinn, P.J. & Williams, W.P. (1983) "The Structural Role of Lipids in Photosynthetic Membranes" *Biochim. Biophys. Acta* 737, 223 - 266
- Robinson, N.C., Strey, F. & Talbert, L. (1980) "Investigation of the Essential Boundary Layer Phospholipids of Cytochrome c Oxidase Using Triton X-100 Delipidation", *Biochemistry* 19, 3656 - 3661
- Roman, R.R. & Keana, J.F.W. (1982) "Nitroxide Spin-Labelled Analogs of the Non-ionic Detergent Triton X-100", *Chem. Phys. Lipids* 31, 161 - 168
- Ronchi, S., Zapponi, M.C. & Ferri, G. (1969) "Inhibition by Pyridoxal-Phosphate of Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase", *Eur. J. Biochem.* 8, 325 - 331
- Ryba, N.J.P., Horvath, L.I., Watts, A. & Marsh, D. (1987) "Molecular Exchange at the Lipid-Rhodopsin Interface: Spin Label Electron Spin Resonance Studies of Rhodopsin-Dimyristoylphosphatidylcholine Recombinants", *Biochemistry* 26, 3234 - 3240
- Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660, wiedergegeben in Cantor & Schimmel (1980)
- Schmidt, D.E. Jr. & Westheimer, F.H. (1971) "pK of the Lysine Amino Group at the Active Site of Acetoacetate Decarboxylase", *Biochemistry* 10, 1249 - 1253
- Squier, T.C. & Thomas, D.D. (1986a) "Methodology for Increased Precision in Saturation Transfer Electron Paramagnetic Resonance Studies of Rotational Dynamics", *Biophys. J.* 49, 921 - 935
- Squier, T.C. & Thomas, D.D. (1986b) "Applications of New Saturation Transfer Electron Paramagnetic Resonance Methodology to the Rotational Dynamics of the Ca-ATPase in Sarcoplasmic Reticulum Membrane", *Biophys. J.* 49, 937 - 942

- Streckenbach, B., Schwarz, D. & Repke, K.R.H. (1980) "Analysis of Phosphoryl Transfer Mechanism and Catalytic Centre Geometries of Transport ATPase by means of Spin-Labelled ATP", *Biochim. Biophys. Acta* 601, 34 - 46
- Takahashi, K. (1968) "The Reaction of Phenylglyoxal with Arginine Residues in Proteins", *J. Biol. Chem.* 243, 6171 - 6179
- Tanford, C. (1980) in "The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes" (Tanford, C., ed.) Wiley-Interscience, New York
- Thomas, D.D., Seidel, J.C., Hyde, J.H. & Gergely, J. (1975) "Motion of Subfragment-1 in Myosin and Its Supramolecular Complexes: Saturation Transfer Electron Paramagnetic Resonance", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 1729 - 1733
- Thomas, D.D., Dalton, L.R. & Hyde, J.S. (1976) "Rotational diffusion studied by passage saturation transfer electron paramagnetic resonance" *J. Chem. Phys.* 65, 3006 - 3042
- Träuble, H., Teubner, M., Wooley, P. & Eibl, H. (1976) "Electrostatic Interactions at Charged Lipid Membranes. I. Effects of pH and Univalent Cations on Membrane Structure", *Biophys. Chem.* 4, 319 - 342
- Vance, D.E. & Vance, J.E. (1985) "Biochemistry of Lipids & Membranes" (Vance & Vance, eds.), Benjamin & Cummings, Menlo Park
- Van Dijk, P.W.M., de Kruijff, B., Verkleij, A.J., van Deenen, L.L.M. & de Gier, J. (1978) "Comparative Studies on the Effects of pH and Ca^{2+} on Bilayers of Various Negatively Charged Phospholipids and their Mixtures with Phosphatidylcholine", *Biochim. Biophys. Acta* 512, 84 - 96
- Vanoni, M.A., Simonetta, M.P., Curti, B., Negri, A. & Ronchi, S. (1987) "Phenylglyoxal modification of arginines in mammalian D-amino-acid oxidase", *Eur. J. Biochem.* 167, 261 - 267

- Volwerk, J.J., Mersny, R.J., Patapoff, T.W., Jost, P.C. & Griffith, O.H. (1987) "Multiple Equilibria Binding Treatment of Lipid and Detergent Interactions with Membrane Proteins. Application to Cytochrome c Oxidase Solubilized in Cholate", *Biochemistry* 26, 466 - 475
- Wallach, D.F.H., Verma, S.P. & Fookson, J. (1979) "Application of Laser Raman and Infrared Spectroscopy to the Analysis of Membrane Structure", *Biochim. Biophys. Acta* 559, 153 - 208
- Watts, A., Davoust, J., Marsh, D. & Devaux, P.F. (1981) "Distinct States of Lipid Mobility in Bovine Rod Outer Segment Membranes. Resolution of Spin Label Results" *Biochim. Biophys. Acta* 643, 673 - 676
- Watts, A. & DePont, J.J.H.M., eds. (1985/1986), "Progress in Protein-Lipid Interactions" Vol.1, 2, Elsevier, Amsterdam (Beiträge über NMR-Spektroskopie)
- Weissberger, A., DuValle, J.E. & Thomas, D.S. Jr. (1943) "Oxidation Processes XVI. The Autoxidation of Ascorbic Acid" *J. Amer. Chem. Soc.* 65, 1934 - 1939
- Wong, P.T.T. (1984) "Raman Spectroscopy of Thermotropic and High-Pressure Phases of Aqueous Phospholipid Dispersions", *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 13, 1 - 24
- Yang, S.F., Freer, S. & Benson, A.A. (1967) "Transphosphatidylolation by Phospholipase D", *J. Biol. Chem.* 242, 477 - 484
- Yu, C.A., Yu, L., & King, T.E. (1975) "Studies on Cytochrome Oxidase. Interaction of the Cytochrome Oxidase Protein with Phospholipids and Cytochrome c", *J. Biol. Chem.* 250, 1383 - 1392

Lebenslauf

Name: Michael Drees

Geburtstag: 28. 04. 1958

Geburtsort: Siegen

Eltern: Hermann Drees

Annemarie Drees, geb. Heinig

Schule: 04. 1964 - 07. 1967: Grundschule in Hagen

09. 1967 - 06. 1976: Gymnasium in Hagen

Studium: 10. 1976 - 03. 1982: Chemie an der Universität Dortmund

Abschluß Diplomprüfung

Diplomarbeit am Institut für Anorganische Chemie, Dortmund, bei

Prof. Dr. D. Naumann: "Untersuchungen zur Umsetzung von

Methylquecksilberfluorid mit Fluoridionenakzeptoren"

Grundwehrdienst: 07. 1982 - 09. 1983 in Neumünster, Seeth und Munster

Dissertation: 09. 1984 - 04. 1988 am Institut für Physikalische Biochemie,

München bei PD Dr. K. Beyer

